

2ej
41



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA FAGOCITICA
DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES
EN PACIENTES CON ABSCESO HEPATICO
AMIBIANO.**

T E S I S

**Que para obtener el título de
Químico Farmaceutico Biólogo**

p r e s e n t a

Norma del Carmen Galindo Sevilla



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE :

	Hoja
I. INTRODUCCION	5
II. GENERALIDADES	9
1. Inflamación	9
2. Métodos de evaluación de la respuesta infla matoria	30
3. Influencia del organismo patógeno sobre la respuesta inflamatoria	36
III. MATERIALES Y METODOS	40
1. Pacientes	40
2. Controles	40
3. Sueros	40
4. Obtención de células	41
5. Ensayo de Quimiotaxis	42
6. Ensayo de quimioluminiscencia	44
7. Estandarización de la técnica de quimiotaxis	46
8. Estandarización de la técnica de quimiolu-- miniscencia	52
IV. RESULTADOS	59
V. DISCUSION	73
VI. CONCLUSIONES	75
VII. BIBLIOGRAFIA	76

I. INTRODUCCION:

La amibiasis en nuestro País es una enfermedad de fuertes repercusiones socioeconómicas, debido a que afecta a una buena parte de la población general. Se estima aproximadamente que un 5 a 6% se encuentra infectada por Entamoeba histolytica presentando o no manifestaciones clínicas (1-3). Generalmente los trofozoitos viven como comensales inofensivos en el cólon sin producir síntomas de enfermedad; en otras ocasiones, sin embargo, pueden ocasionar disentería, ameboma o lesiones extraintestinales, de las cuales la más importante es el Absceso Hepático Amibiano (AHA). A la fecha aún no se ha podido esclarecer si existe algún mecanismo por el cual las amibas puedan transformarse de comensales inofensivos a virulentas ó si simplemente sea la invasión al individuo por cepas de amibas con mayor poder de patogenicidad lo que dá la pauta para que éste se enferme (3-7).

En México según el I.M.S.S., la amibiasis ocupa el cuarto lugar de incidencia anual dentro de los padecimientos transmisibles, por estudios realizados en 1983 con 26.5 millones de derechohabientes, los cuales presentan un 4.69% de incidencia (8). Al analizar las estadísticas en base a la complicación más importante (AHA), se aprecia que en 1971 un 2% de los internamientos en hospitales generales de esta institución correspondieron a AHA con un 9% de mortalidad. La mayor frecuencia de los casos se registró en adultos masculinos de 20 a 60 años de edad (9).

Agente Etiológico:

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis, pertenece a la familia Entamoebidae, orden Amoebida, subfilium Sarcodina, de los protozoarios formadores de pseudópodos de la superclase Rhizopoda, clase Lobosea.

Puede ser observada en las heces de pacientes con amibiasis como trofozoito, prequiste, metaquiste y quiste.

Trofozoito es la forma móvil de Entamoeba histolytica cuenta con gran capacidad fagocítica, enzimática y citopatogénica, tiene dimensiones variables que fluctúan entre 10 y 60 μm . posee un solo núcleo de 3-5 μm . con cromatina periférica y nucleolo central. El citoplasma consiste de un endoplasma granular con numerosas vacuolas.

Prequiste y metaquiste son formas de transición entre etapas de quiste y de trofozoito.

Quiste es la forma de resistencia del parásito, es oval ó redondo con variaciones en su diámetro entre 5 y 20 μm . dependiendo de su madurez presenta de uno a cuatro núcleos.

Es inmóvil y sobrevive varios días fuera del organismo siendo por ello responsable de la transmisión de este protozooario cuyo único huesped natural es el hombre (5-7, 11).

Mecanismos citopatogénicos de E. Hystolytica.

En el estudio de los mecanismos de citopatogenicidad se han descrito varios como responsables: a) la gran actividad enzimática de la amiba, b) su capacidad fagocítica y citotóxica, c) la inducción de inmunosupresión en el huésped, d) el escape de los mecanismos de defensa a través del mimetismo antigénico y del recambio frecuente de sus componentes membranales. Sin embargo, a la fecha, aún no se han podido unificar estas observaciones para establecer el mecanismo citopatogénico de E. histolytica, siendo evidente la necesidad de un conocimiento más profundo de la relación huésped-parásito en esta entidad.

Entre las situaciones poco conocidas se encuentra el papel que juegan los mecanismos inespecíficos de defensa del huésped, como sería la inflamación. Al respecto, estudios realizados en autopsias revelan que las alteraciones histológicas producidas por la invasión de este parásito a los tejidos son extensas zonas de necrosis de tipo lúctico con ligera reacción inflamatoria (4, 5, 11-15). Disecando los componentes que intervienen en este proceso nos encontramos con la presencia de leucocitosis con neutrofilia (15, 16), elevados títulos de complemento y de anticuerpos específicos (17, 18) que en primera instancia nos señalan que debe de estar ocurriendo un proceso inflamatorio y el otro punto a seguir es entonces estudiar si los leucocitos desempeñan adecuadamente su función.

Estudios realizados en individuos con diferentes formas de amibiasis (intestinal, hepática y portadores) y en individuos sanos sobre la capacidad de los monocitos y de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) para ingerir Staphylococcus señalan

que no existen diferencias en la capacidad fagocítica de monocitos y de PMN de los diferentes grupos, con excepción de aquellos provenientes de AHA que presenten una respuesta disminuida en comparación con cualquiera de los otros grupos (19). También se ha reportado que sobrenadantes de cultivo axénico de amibas son capaces de inhibir la quimiotaxis de monocitos humanos de individuos sanos, sin afectar la respuesta quimiotáctica de PMN (20).

En modelo animal de amibiasis experimental en hamsters se observa que los estadios tempranos de la lesión están caracterizados por la presencia de un gran infiltrado celular que corresponde principalmente a PMN que van desapareciendo paulatinamente del foco de la lesión presuntamente por el efecto citopatogénico tan fuerte que ejerce la amiba sobre ellos (21). Estas observaciones se han repetido cuando se utilizaron gerbos como animales experimentales (22), cimentando la duda que sigue latente al rededor del estado funcional de los leucocitos en pacientes con amibiasis.

Hipótesis.

Partiendo del hecho de que existe mínima respuesta inflamatoria circundante al absceso en estos pacientes, creemos que algunos de los pasos del proceso inflamatorio pueden estar afectados, bien sea por un defecto intrínseco de las células o porque la amiba ejerza algún efecto sobre ellas capaz de inhibir la respuesta e incluso anularla. El presente trabajo plantea el estudio tanto de la respuesta de quimiotaxis como de la capacidad fagocítica de los leucocitos PMN de pacientes con absceso hepático amibiano.

II. GENERALIDADES.

1. Inflamación.

La inflamación representa una respuesta del tejido vivo a una agresión externa, la cual se manifiesta en una acumulación de células y fluido sanguíneo. Es un proceso primario, no específico de defensa de un organismo contra agentes agresores externos (23-26).

Está caracterizada por signos clínicos locales que clásicamente se definen como calor, rubor, tumor, dolor y pérdida o disminución de la función del órgano o tejido (24).

Entre los agentes agresores que despiertan una respuesta inflamatoria podemos mencionar como agentes físicos: el calor, los traumatismos y la energía eléctrica y radiante; como agentes químicos: los ácidos, los álcalis y algunos solventes y como agentes biológicos: virus, hongos, bacterias y parásitos (25).

Siempre que un tejido es agredido, en el sitio de la lesión ocurren una serie de eventos que tienden a limitar la invasión o a eliminar al agente agresor. Esta respuesta es independiente de la naturaleza del agente que esté provocando el daño.

Los principales eventos de esta respuesta inflamatoria son vasculares y están caracterizados por la salida de fluido y de leucocitos, cuya finalidad es la reparación del daño.

De acuerdo con el tiempo de duración la respuesta inflamatoria se ha clasificado como aguda o crónica, presentando cada una de ellas un patrón característico de conducta. Para los fines del presente trabajo enfocaremos nuestra atención sobre la

respuesta inflamatoria aguda, que está caracterizada por tres - principales eventos vasculares:

- a). Vasodilatación y cambios en el flujo sanguíneo.
- b). Extravasación de plasma.
- c). Extravasación de leucocitos.

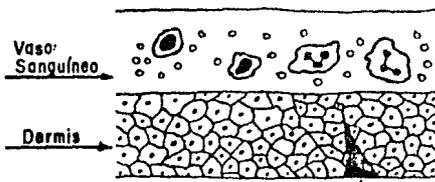
- a). Inicialmente ocurren cambios en el flujo, calibre y permeabilidad vascular: existe dilatación arteriolar y aumento del flujo sanguíneo por arteriolas con congestión de la circulación venosa de salida que conduce hacia un aumento de la presión hidrostática, favoreciendo la extravasación de fluido e incrementando la permeabilidad de la microvasculatura.
- b). El líquido extravasado en etapas iniciales es un trasudado ó ultrafiltrado del plasma, posteriormente los cambios de permeabilidad en vénulas y capilares pronto permiten el escape de proteínas plasmáticas, leucocitos y ocasionalmente eritrocitos.
- c). En la extravasación de leucocitos se advierten varios fenómenos a saber: marginación y pavimentación, migración, quimiotaxis y fagocitosis (Figura 1).

Marginación y Pavimentación:

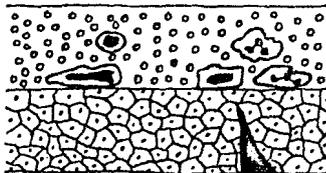
En la sangre que fluye de manera normal, los leucocitos y eritrocitos en los microvasos están circunscritos a la columna central axial, dejando una capa de plasma comparativamente libre de células en contacto con la pared vascular (Figura 2 A). Al sobrevenir lentitud y estancamiento del flujo (Fig. 2 B) los leucocitos se desprenden de la columna central y adoptan sitios en contacto con el endotelio (Figura 2 C). Este fenómeno de adhe

Figura.- 1

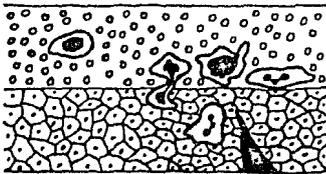
EVENTOS CELULARES DURANTE LA INFLAMACION



Célula Circulando Normalmente



Marginación y Pavimentación Celular



Migración Celular: Diapedesis



Quimiotaxis



Fagocitosis

- Opsonización
- Ingestión: Formación de Vacuola Digestiva
- Muerte Intracelular del microorganismo ingerido: Mecanismos oxidativos
- Mecanismos no oxidativos

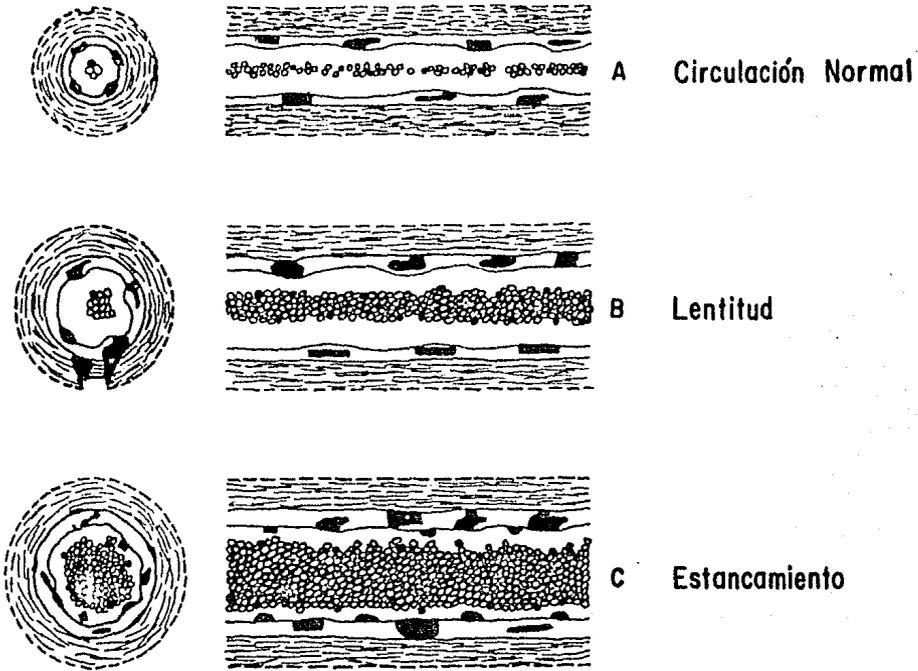


Figura.-2 Marchesi, V. T. Anderson's Pathology: 1985

sión leucocitaria podría ser atribuible a cambios en las células endoteliales, pero el mecanismo bioquímico aún se desconoce (25).

Migración:

Este término denota el fenómeno por virtud del cual los leucocitos móviles escapan de los vasos sanguíneos para llegar a los tejidos perivasculares. Las células móviles introdu

cen pseudópodos grandes en las hendiduras existentes entre las células endoteliales y fluyen o reptan a través de las uniones interendoteliales ensanchadas (Figura 3 A, B), hasta adoptar una posición entre la célula endotelial y la membrana basal (Figura-3 C). Posteriormente, por algún camino secundario aún desconocido, que bien pudiera ser el resultado de un esfuerzo físico aunado o no a actividad enzimática, atraviesan la barrera, al parecer impermeable, de la membrana basal hasta alcanzar el sitio extravascular (Figura 3 D).

Los eritrocitos también pueden salir de los vasos sanguíneos, particularmente en lesiones graves. A diferencia del leucocito, el eritrocito parece ser expulsado pasiva e involuntariamente del vaso lesionado por presión interna, después de los leucocitos migratorios. Esto explica la aparición de exudados hemorrágicos en las reacciones inflamatorias más graves.

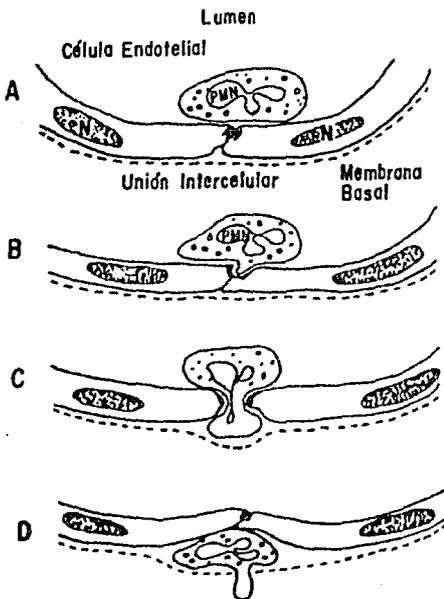


Figura.-3

Marchesi, V. T.

Anderson's Pathology, 1985

Quimiotaxis:

Es la respuesta celular a la detección de un gradiente químico. Algunas células poseen receptores para algunas sustancias que cuando se les unen estimulan el movimiento celular hacia el sitio en que se encuentran en mayor concentración (27-32). Las células que responden primordialmente a estos estímulos químicos son los leucocitos polimorfonucleares que incluyen neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Los monocitos también responden a estímulos quimiotácticos para PMN, no así los linfocitos que en cambio migran hacia sustancias liberadas por linfocitos estimulados con antígeno (25).

El principal agente quimiotáctico para leucocitos es el péptido C_5a derivado del complemento. Otros serían el leucotrieno B_4 , C_{567} , calicreína, prostanglandina E_1 y productos liberados por linfocitos y polimorfonucleares. Entre los agentes quimiotácticos exógenos más potentes se encuentra el péptido n-formil-metionil-leucil-fenilalanina, importante en la iniciación de la síntesis de proteínas bacterianas (27, 33, 34).

El mecanismo más profundamente estudiado ha sido el de unión de n-formil-metionil-leucil-fenilalanina a su receptor en el leucocito PMN neutrófilo. La interacción del ligando con su receptor inicia el incremento en el metabolismo oxidativo de la glucosa, el consumo de oxígeno, la generación de anión superóxido, exocitosis de gránulos citoplásmicos conteniendo un amplio espectro de enzimas y péptidos, cambios en la forma e incremento en la capacidad de adherencia celular, migración direccional, fagocitosis de partículas con que hacen contacto las células, generación de metabolitos del ácido araquidónico y una va

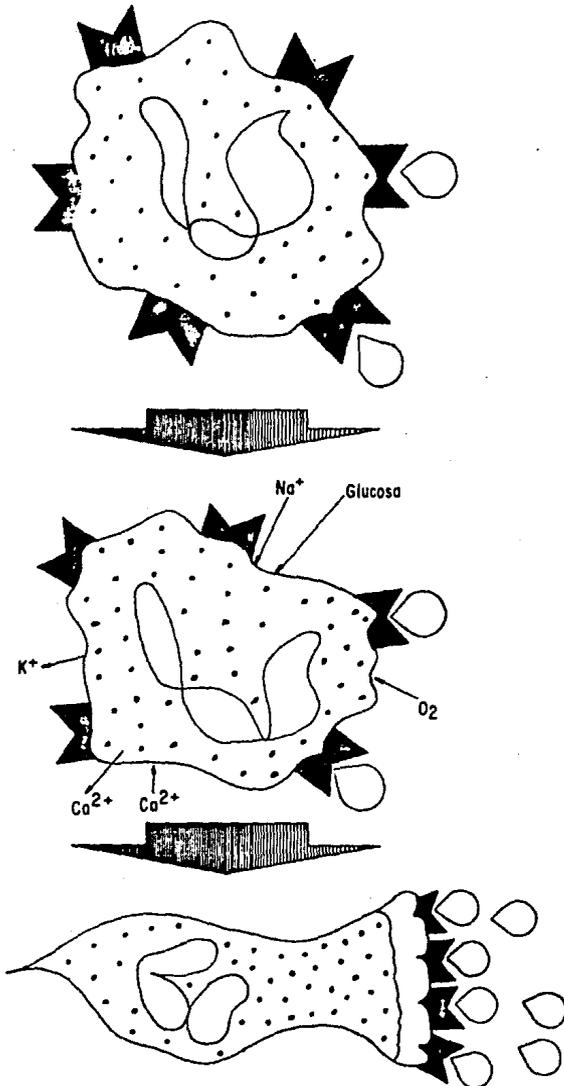
riedad de reacciones bioquímicas intermediarias (28).

Se ha visto que estos receptores existen en dos estados de afinidad diferente para su ligando. La unión del ligando a receptores de alta afinidad estimula el movimiento celular, mientras que la unión a receptores de baja afinidad estimula la función secretora microbicida del PMN (30).

La unión del quimioatrayente a la membrana celular altera el potencial transmembrana y activa el flujo de iones. Se produce una elongación polarizada de la célula con un borde anterior amplio (lamelipodio) y uno pequeño posterior (urópodo), en el cual se localizan los gránulos de la célula en movimiento. El borde conductor del pseudópodo se llena de microfilamentos de actina que se extienden como una fina capa submembranosa alrededor de la célula y luego reaparecen como haces densos en el urópodo. Estos microfilamentos proporcionan el sosten estructural y junto con las moléculas de miosina y otras proteínas reguladoras como profilina, acumentina y gelsolina (35), son capaces de contraerse proporcionando así las fuerzas dinámicas necesarias para el movimiento celular. También existen microtúbulos en la célula, pero no intervienen en la movilidad, más bien sirven como esqueleto interno que aumenta la rigidez y mantiene la forma de la célula. Figura 4 (27, 28, 35). Estas microfibrillas también parecen ser las estructuras causantes de la persistencia del movimiento en una dirección específica a falta de un gradiente quimiotáctico: Migración al azar. Un incremento en la velocidad de movimiento, no necesariamente en una dirección definida es denominado quimiocinesis (36).

Figura.- 4

Eventos metabólicos que ocurren durante la respuesta quimiotáctica



(I) Reconocimiento del gradiente quimiotáctico a través de la interacción del factor quimiotáctico con los receptores de la superficie celular.

(II) Conversión de la información extracelular a intracelular en respuesta al gradiente celular quimiotáctico resulta en:

- a) Alteración del Potencial Transmembrana
- b) Flujo Iónico
- c) Activación del Proceso Metabólico

(III) Contracción polarizada de la célula en dirección del gradiente quimiotáctico, inducida por: la reorganización de los elementos contractiles de la célula Microtúbulos y Microfilamentos

Factor Quimiotáctico 

Receptor del Factor Quimiotáctico 

Snyderman, R. Science 1981

Tanto los granulocitos como los monocitos emigran simultáneamente, solo que los granulocitos son más móviles y llegan antes al foco inflamatorio. Sin embargo, la vida media de los PMN es corta, aproximadamente 6 o 7 horas (37), y de formar la principal población celular del sitio inflamado en las primeras horas, son reemplazados por monocitos que llegan más tarde.

Fagocitosis:

En este importante evento las células que participan tienen por finalidad eliminar el agente extraño o remover de los tejidos las células dañadas ó envejecidas, para lo cual las ingieren y degradan.

Es una continuación de los eventos anteriores y se vé favorecida cuando existe una previa opsonización o forramiento, proceso que vuelve más susceptible a los agentes extraños a ser ingeridos por las células fagocíticas.

La opsonización puede ocurrir por anticuerpos IgG específicos de las clases IgG₁ e IgG₃ que recubren la partícula y para las cuales los fagocitos poseen receptores para el fragmento Fc de la molécula, formando una especie de puente que acerca la partícula al fagocito.

Otro camino puede ser la unión específica Ag-Ac, que activando la vía clásica del complemento forma C₃b, para el cual los fagocitos también poseen receptores. Además se puede fijar C₃b sobre la superficie de la partícula a través de la vía alterna del complemento; este proceso sería inespecífico.

Cuando la partícula se encuentra adecuadamente opsonizada se dispara el proceso de ingestión de ésta, y de la misma mane

ra que durante la quimiotaxis, se activa el sistema de microfilamentos de actina y miosina formándose pseudópodos que engloban a la partícula y cuyos extremos posteriormente se fusionan formando una vacuola fagocítica, a la cual se vierte el contenido de los gránulos celulares y se disparan los mecanismos oxidativos y no oxidativos tendientes a degradar la partícula ingerida (38).

La célula fagocítica por excelencia es el leucocito polifonuclear que es producido en la médula ósea y liberado a la circulación donde existe normalmente un promedio de 1880 a 7000 neutrófilos por microlitro de sangre, en individuos adultos (37). Fig. 5.

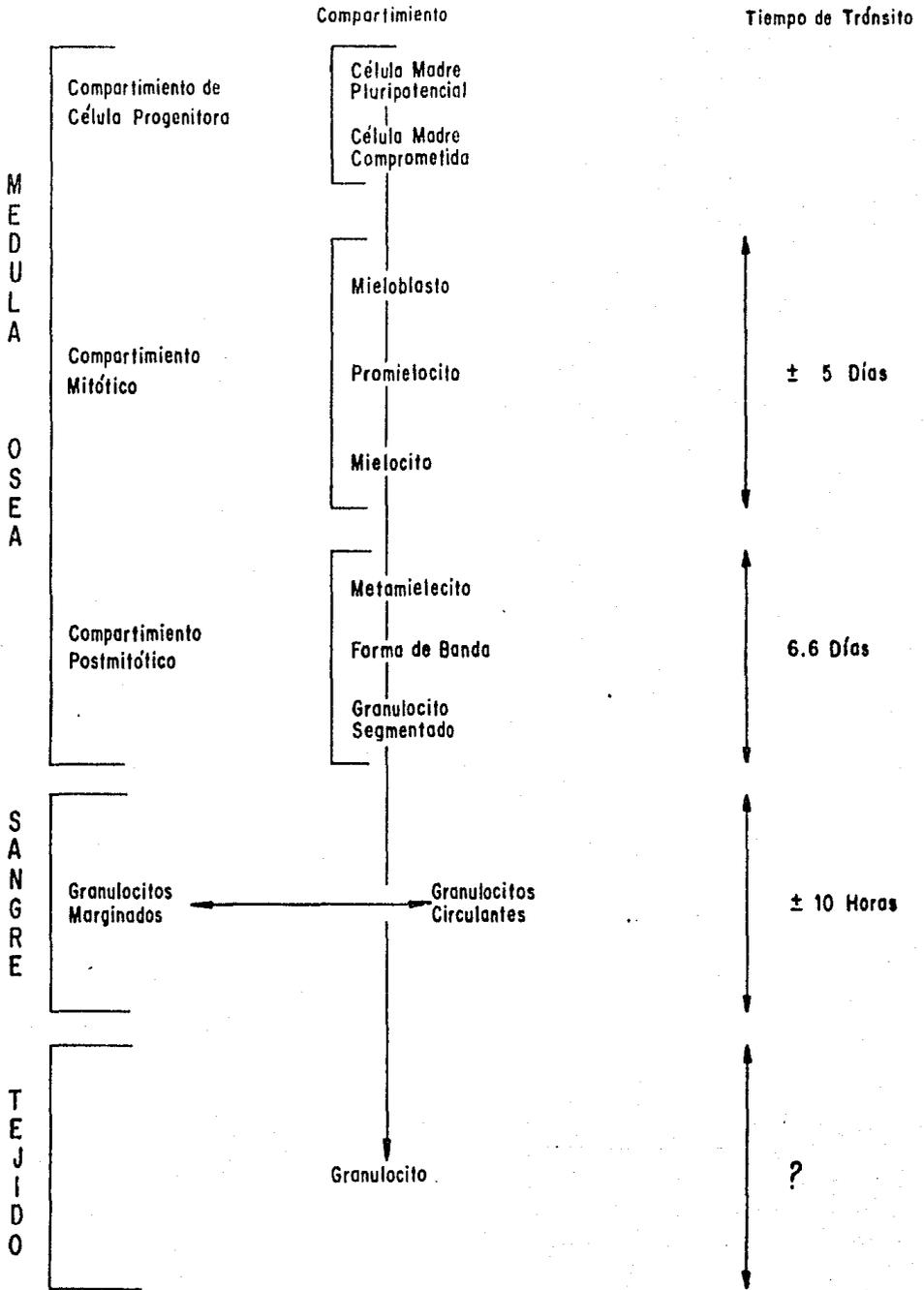
El proceso de maduración del PMN dura aproximadamente dos semanas, durante las cuales estas células adquieren dos tipos de gránulos intracitoplásmicos: azurófilos o primarios y específicos o secundarios. Los primeros son formados durante el estado pro mielocítico y los segundos durante el mielocítico.

Los gránulos azurófilos contienen enzimas del sistema microbicida que están involucradas en la digestión de organismos o en la destrucción de células blancas, como serían las mieloperoxidasa, hidrolasas ácidas, proteasas neutras, proteínas catiónicas y lisozima.

Se ha visto que los gránulos específicos contienen lactoferrina, vitamina B₁₂, fosfolipasa A₂ y aproximadamente dos tercios de la lisozima celular. Estos gránulos dan a la célula su característico color rosado cuando es teñida con colorante de Wright o de Giemsa (39).

Después de que una partícula es fagocitada, estos gránulos se vierten en la vacuola fagocítica o fagosoma, dando comienzo a procesos de degradación de la partícula ingerida, que se han clasificado como oxidativos y no oxidativos (39-42).

Figura.- 5



Los eventos que ocurren durante el proceso oxidativo -
son:

- a) Incremento en el consumo de oxígeno.
- b) Incremento en el flujo de glucosa en la ruta de la hexosa mono-
fosfato.
- c) Incremento en la producción de superóxido (O_2^-) y peróxido de -
hidrógeno (H_2O_2).
- d) Incremento en la fijación de iodo inorgánico a la forma enlaza-
da a proteínas.
- e) La generación de luz: fenómeno de quimioluminiscencia.

Se incrementa el consumo de glucosa por la vía de la -
hexosa monofosfato y se produce NADPH cuando la Glucosa-6-fosfato
es oxidada a 6-fosfoglucono- γ -lactona y posteriormente cuando el
6-fosfogluconato es transformado en d-ribulosa-5-fosfato. Este --
NADPH es utilizado por la NADPH-oxidasa (una flavoproteína) para
producir superóxido a partir de oxígeno molecular.

El NADPH también es utilizado por la glutathion peroxida-
sa y por la catalasa en la conversión de peróxido de hidrógeno a
agua y oxígeno; ambas enzimas se localizan en el citoplasma celu-
lar, lo cual sugiere que juegan un importante papel protector so-
bre el dañino peróxido de hidrógeno que se pueda difundir al cito-
plasma.

El H_2O_2 se forma a partir de la dismutación espontánea -
de O_2^- , el cual es inestable en solución acuosa y más aún a pH ba-
jo. Esta dismutación también puede ser catalizada por la superóxi-
do dismutasa (SOD).

Ambos productos en solución y en presencia de metales -
catalíticos, tales como el fierro, pueden reaccionar entre sí y -

formar radicales oxhidrilo: $\text{OH}\cdot$, que también pueden ser producidos directamente de la reducción del peróxido de hidrógeno.

Una rápida y no catalítica dismutación de O_2^- conduce a la formación de singlete de oxígeno ($^1\text{O}_2$) y peróxido de hidrógeno. Esta última especie también puede ser producida por la reacción de H_2O_2 con OCl^- que nos da $^1\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^-$.

Todas las especies anteriores representan estados excitados del oxígeno, altamente reactivas y sumamente tóxicas por ello para los organismos.

El singlete de oxígeno: $^1\text{O}_2$ por ejemplo, reacciona ávidamente con moléculas orgánicas de alta densidad electrónica (enlaces de carbono insaturados) formando deoxietanos sustituidos. Estos grupos son lábiles y se disocian formando grupos carbonilo excitados electrónicamente, los cuales liberan su energía emitiendo fotones. Otras especies oxidantes generadas por los PMN que actúan cooperativamente con el oxígeno son las formas oxidadas de los metales: Cu^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{3+} , Se^{3+} .

El sistema de la mieloperoxidasa juega un papel importante en la destrucción de microorganismos. La MPO es una enzima hemo con peso molecular aproximado de 150,000 daltones que utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato puede oxidar los iones haluro con la consiguiente formación del hipohaluro, los cuales funcionan también como poderosos oxidantes. Se han propuesto varios mecanismos sobre la acción microbicida del sistema de la MPO- H_2O_2 -haluro, a saber:

i) La halogenación de sitios blanco como residuos de tirosina, aminas, amidas y grupos sulfhidrilos de los microorganismos, con la resultante pérdida de su función ó estructura.

ii) Descarboxilación oxidativa de aminoácidos con la generación de aldehidos tóxicos. Esto es, cuando se encuentra Cl^- en el medio, junto con MPO y H_2O_2 los aminoácidos ó proteínas pueden ser clorinados formándose potentes cloraminas o cloramidas tóxicas, - las cuales conservan el poder oxidante del hipohaluro.

La formación de estos productos tiene como consecuencia la descarboxilación y desaminación de los aminoácidos formándose CO_2 , amonio y un aldehído.

Figura 6.

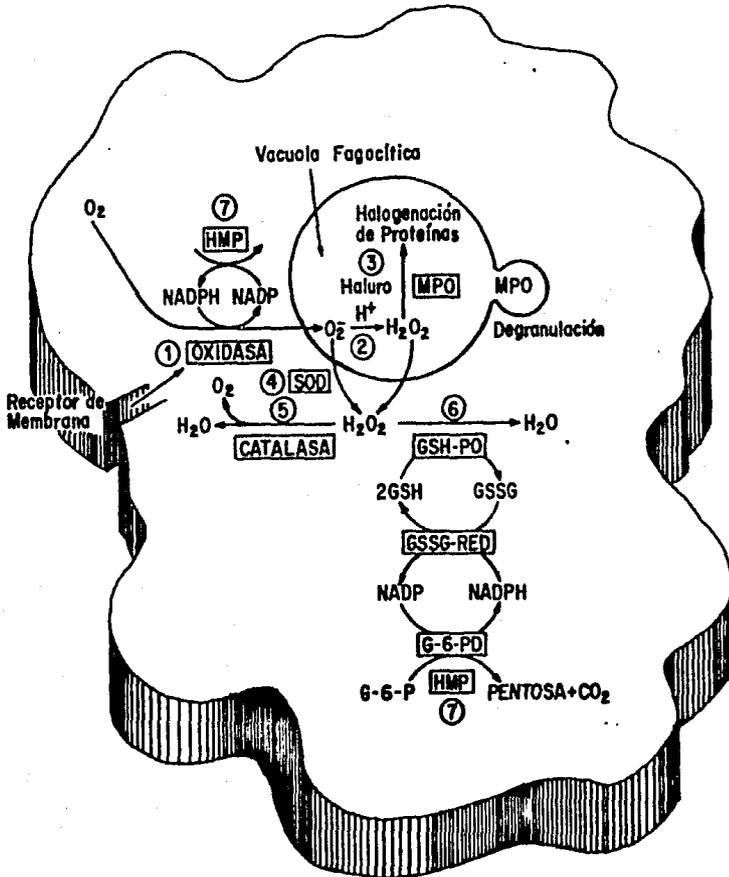
Aunado a todo esto, la formación de peróxidos lipídicos y grupos carbonilos producidos durante la interacción de las formas excitadas de O_2 con los enlaces insaturados de carbono, representa otro mecanismo importante de generación de especies con gran potencial de oxidación propagable.

En los microorganismos los principales sitios susceptibles a ataque oxidativo son los siguientes:

<u>Sitio</u>	<u>Consecuencia</u>
Enlaces de carbono insaturados - Formación de grupos carbonilo: aldehídos, cetonas, ac.orgánicos - Peroxidación de lípidos	Pérdida de la funcionalidad de la membrana.
Grupos sulfhidrilos.	Pérdida de la función de enzimas que contienen grupos -SH. Eliminación del poder reductor (por ejemplo del glutatión).
Grupos amino. - formación de cloraminas.	Reacciones de descarboxilación. Rompimiento de los enlaces pépticos. Pérdida de la actividad enzimática.
Acidos nucleicos.	Reacciones de oxidación secundaria. Rompimiento con pérdida de la capacidad de replicación.
Sitios activos de enzimas hemo	Pérdida de la actividad de oxidoreductasa.

Figura.- 6 PRINCIPALES EVENTOS DEL METABOLISMO OXIDATIVO QUE OCURREN DURANTE LA FAGOCITOSIS.

1. Como consecuencia de la estimulación de la membrana se activa la NAD(P) H-Oxidasa que cataliza a la reducción de O_2 a O_2^- , mediante la transferencia de un electrón del NAD (P)H.
2. Por dismutación espontánea O_2^- se transforma en H_2O_2 y O_2 .
3. Se deposita en la vacuola fagocítica mieloperoxidasa (MPO), que utilizando H_2O_2 e iones haluro como sustratos cataliza importantes reacciones microbici- das como halogenación de proteínas.



4. El superóxido que se escapa de la vacuola fagocítica es reducido a peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa (SOD).
5. El peróxido de hidrógeno a su vez es reducido por catalasa a oxígeno y agua.
6. La glutatión peroxidasa (GSH-PO) cataliza la oxidación de GSH por H_2O_2 ; la glutatión reductasa (GSSG-RED) utiliza $NADPH$ como sustrato para reducir glutatión oxidado (GSSG).
7. El $NADPH$ es producido por la oxidación de la glucosa en la ruta de la hexosa-monofosfato.

Root, R.K.; Cohen, M.S.: *Rev. Infections Dis.* 1981

<u>Sitio</u>	<u>Consecuencia</u>
Reducción de los nucleótidos de piridina.	Pérdida del poder reductor de las células.
Disminución en la relación - NAD(P)H : NAD(P).	Inhibición en la biosíntesis de lípidos.
Ref. 36: Tabla 2. p 577.	

La generación de luz, fenómeno denominado quimioluminiscencia, proviene de las especies excitadas de oxígeno, principalmente del singlete de oxígeno (1O_2), el cual se produce en dos formas: - Sigma 1O_2 que posee electrones antiparalelos en diferentes órbitas y Delta 1O_2 en donde los electrones antiparalelos se encuentran en la misma órbita.

Cuando estas formas retornan a su estado energético original, liberan energía en forma de fotones y fluorescencia característica (39-44).

Por otro lado tenemos los procesos independientes de oxígeno en donde como principales efectores tenemos:

a). La acidificación del medio en el fagosoma, en donde el pH desciende debido principalmente a la formación de lactato durante la glucólisis y a que se vierten productos ácidos de los gránulos, lo cual influye sobre los organismos a degradar, afectándolos directamente bien sea por ácidos orgánicos o lipofílicos o proporcionando un medio óptimo para el funcionamiento del sistema de la MPO.

b). La acción de la lisozima, enzima que hidroliza la pared celular de los microorganismos; esta enzima es una pequeña proteína catiónica, estable al calentamiento, que ataca específicamente enlaces glucosídicos β (1-4), que unen al Ac. N-acetil murámico con N-acetil-glucosamina, del péptido glicano.

c). La presencia de proteínas catiónicas ricas en arginina, general

mente de bajo peso molecular que oscila entre 10,000 y 25,000 daltones. Son más activas a pH neutro, afectando la capacidad de los microorganismos para desarrollarse sin destruir su integridad estructural. Actúan principalmente en cooperación con otros mecanismos antimicrobianos.

d). La acción de la lactoferrina, proteína de alto peso molecular: 77,000 daltones, que posee una fuerte afinidad por el hierro y a altas concentraciones puede inhibir el desarrollo de los microorganismos por competir con ellos por el hierro del medio. Aproximadamente dos tercios de esta proteína son liberados al medio extracelular.

e). Proteasas que son más activas a pH neutro como serina esterasa, elastasa, colagenasa, catepsinas G, D y E, cuya función parece ser más degradativa que microbicida. Su actividad es inhibida por factores séricos y tisulares tales como α -1-antitripsina y α -2-macroglobulina.

f). Finalmente se mencionará que existen factores séricos que favorecen la fagocitosis principalmente por su acción opsónica o amplificando la acción de los propios fagocitos, como reportaron Ligh y col., quienes demostraron que tanto IgG como complemento pueden aumentar la capacidad de los monocitos humanos para matar intracelularmente *Staphylococcus* o *Escherichia coli* (39, 44-48).

Es importante señalar que en todos estos acontecimientos está involucrada la participación de diversas sustancias denominadas mediadores. Estos pueden ser clasificados en dos grupos principales: provenientes del plasma y provenientes de los tejidos.

Provenientes del plasma:

- Sistema de las cininas: Se conoce también con el nombre de sistema de la calicreína. Se inicia con la activación del factor XII, la cual conduce finalmente a la formación de calicreína, que actúa sobre la α 2-macroglobulina, formando un péptido de nueve aminoácidos denominado bradicina que provoca una contracción lenta y sostenida de los músculos lisos (incluyendo los de bronquios y vasos sanguíneos), incrementa la permeabilidad vascular, aumenta la secreción de las glándulas mucosas, incluyendo las de los bronquios y estimula las fibras sensibles al dolor.
- El sistema del complemento: De los componentes del complemento que mayor importancia tienen en inflamación son C_3a y C_5a , los cuales inducen liberación no citolítica de histamina de las células cebadas y de basófilos, provocando con ello aumento de la permeabilidad capilar, edema y contracción del músculo liso. C_5a actúa también como un poderoso agente quimiotáctico para leucocitos PMN, así como también el fragmento C_{567} , aunque éste en menor grado.
- Sistema de la coagulación: Se ha visto que los fibrinopéptidos liberados del fibrinógeno por la acción de la trombina durante la coagulación son mediadores inflamatorios que incrementan el efecto de la bradicina y funcionan como agentes quimiotácticos para leucocitos PMN.

Estos tres sistemas interaccionan entre sí cuando el factor XII de la coagulación o de Hageman es activado al ser dañado el endotelio de los pequeños vasos sanguíneos y con ello exponen la colágena. Por un lado el factor XII de la coagulación activa el sistema de las cininas como ya se mencionó y por otro lado desencadena el

sistema fibrinolítico induciendo a través de varias etapas intermedias la formación de plasmina a partir de plasminógeno, la cual es una enzima proteolítica de amplia especificidad que puede digerir no solo la fibrina sino también el fibrinógeno, el factor XII, el V y el VII de la coagulación, la protombinay el inactivador de C_1 , C_3 y C_5 .

Figura 7.

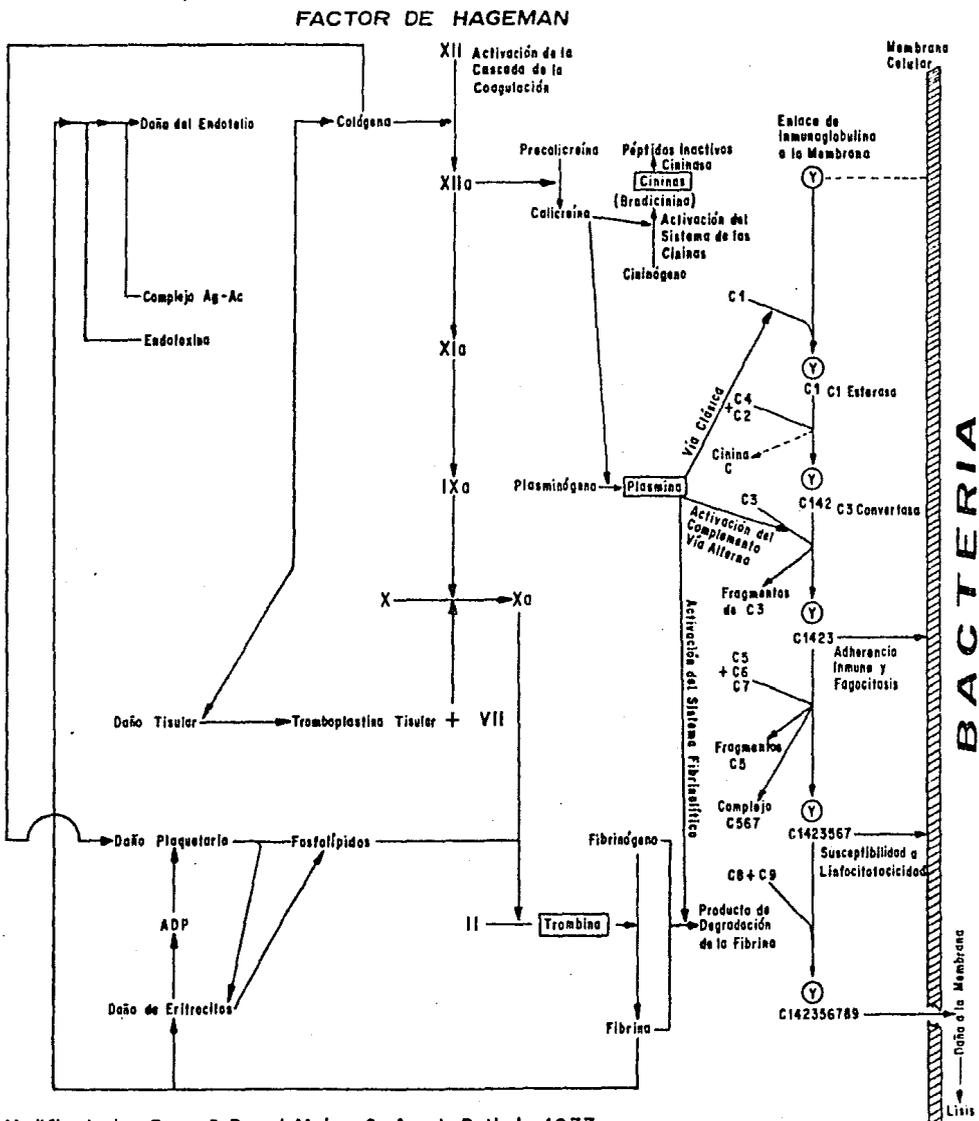
Por otro lado, de los provenientes de los tejidos tenemos:

- Aminas vasoactivas: La más importante es la histamina, que se encuentra almacenada en los gránulos de las células cebadas y de los basófilos y en las plaquetas; ocasiona contracción del músculo liso de los bronquiolos y pequeños vasos sanguíneos, aumento de la permeabilidad de los capilares e incremento de la secreción de las glándulas mucosas de la nariz y de los bronquios. Otra amina vasoactiva es la 5-hidroxitriptamina o serotonina, la cual se encuentra en las células cebadas de los ratones y en las plaquetas humanas. Desempeña un papel farmacodinámico en la anafilaxia de los ratones, ratas y conejos. En el hombre esto no se ha comprobado.

- Derivados del Acido Araquidónico: Este es un ácido graso de veinte carbonos que existe normalmente en la membrana de las células y que es liberado por las fosfolipasas A_2 y C, cuando estas son activadas, como ya se mencionó. El ac. araquidónico es metabolizado por dos vías: La 5-lipooxigenasa que conduce a la producción de leucotrienos: LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 , que forman una mezcla muy potente espasmogénica y vasodilatadora, conocida como sustancia de reacción lenta de la anafilaxia: SRL-A. El LTB_4 es un

Figura.- 7

Interacción de los Diversos Sistemas que son activados durante el daño tisular



Modificado de : Ryan, G. B. and Majno, G. Am. J. Pathol. 1977
 Fareed, J. y col. Clin. Chem. 1983

potente agente quimiotáctico para leucocitos PMN. La otra vía es la de la ciclooxigenasa en la que se producen prostaglandinas y tromboxanos. La PGD_2 es un vasodilatador potente, la PGF_2 funciona como potente broncoconstrictor; las PGE_2 y PGE_1 actúan como potentes bronco y vasodilatadores. La PGI_2 disgrega las plaquetas, en tanto que los tromboxanos TxA_2 y TxB_2 favorecen la agregación plaquetaria y por consiguiente son reguladores poderosos de la coagulación sanguínea y de la homeostasis.

- Componentes lisosomales:

Proteínas catiónicas: Incrementan la permeabilidad vascular. Actúan como agentes quimiotácticos de células mononucleares y como factor inmovilizador de neutrófilos.

Proteasas ácidas: Actúan como liberadores de leucocinina del plasma, además de que si el pH es ácido degrada membranas basales.

Proteasas neutras: Degradan colágena, elastina, cartílago, fibrina, membrana basal renal, generan agentes quimiotácticos de C_3 y C_5 , liberan cininas de los cininógenos del plasma e incrementan la permeabilidad vascular.

- Productos de linfocitos: Básicamente son denominados linfocinas, poseen diferentes actividades como son inhibir la migración de macrófagos y de linfocitos, estimular la proliferación de linfocitos entre otras.

- Por último tenemos diversos mediadores provenientes de tejidos como serían pirógenos endógenos (sustancia P: decapeptido), neurotensina y AMPc (23-26).

2. Métodos de evaluación de la respuesta inflamatoria.

En la evaluación de la respuesta inflamatoria existen diversos parámetros que pueden ser medidos:

- Agregación celular
- Adherencia
- Quimiotaxis
- Opsonización y fagocitosis
- Respuesta metabólica
- Capacidad bactericida (49)

Agregación celular:

La agregación de granulocitos es medida según el método de O'Flaherty y cols, utilizando un equipo nefelométrico electrónico: agregómetro plaquetario que mide partículas de determinado tamaño. Este ensayo es utilizado como parámetro de evaluación *in vitro* de la adhesividad granulocítica y como un bioanálisis para medir la actividad de C_5a , el cual se ha demostrado que incrementa significativamente la adhesividad granulocítica (49).

Adherencia:

La medida de la adherencia granulocítica es importante debido a que la adhesión de los granulocitos al endotelio vascular es un fenómeno primario de la respuesta celular en la inflamación. Para medirla se utiliza principalmente el método de McGregor y cols, en el cual miden la adhesividad celular a fibras de nylon. Si el -

parámetro se encuentra alterado puede disminuir la respuesta del huésped a la infección.

Existen reportes de que se encuentra disminuida la adhesividad en aquellas personas que ingerieron fuertes cantidades de alcohol o en aquellas con corticoesteroides, así como en pacientes con glomerulonefritis postestreptocócica. Un aumento de la adhesividad está relacionado con granulocitopenia y respuesta retardada al estímulo infeccioso (49).

Quimiotaxis:

La capacidad que tienen las células para migrar hacia el sitio que ha sido invadido por agentes extraños se puede medir de diversas maneras:

a) In vivo: Se utilizan cámaras especialmente diseñadas como la ventana de Rebeck que contiene el quimioatrayente y se coloca en el antebrazo del paciente dejándose por veinticuatro horas, al cabo de las cuales se retira y se observa el número y tipo de células que se adhirieron al vidrio de la cámara. Es una medición poco usada, tediosa, cuyos resultados son de reproducibilidad inconstante (34, 49).

b) In vitro: Son las técnicas más utilizadas. Se emplea principalmente la cámara de Boyden, diseñada por éste en 1962, que consta de dos compartimientos separados por una delgada membrana. El agente quimiotáctico C_5a o n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (entre los más usados) se coloca en la parte inferior de la cámara y en la parte superior se adicionan las células. A través del filtro se forma un gradiente de la sustancia quimiotáctica, el que re

conocen las células y migran hacia él esforzándose por atravesar la membrana, que posee poros cuyo diámetro no permiten el paso de las células, a menos que estas se deformen en un esfuerzo por migrar al sitio hacia donde son atraídas. La cámara se incubaba a 37°C., durante un período definido de tiempo (de 30 a 90 minutos, según se establezca), al cabo del cual se remueven las células y se obtiene el filtro, que es fijado y teñido. La interpretación de resultados puede ser de dos maneras: contando el número de células que atraviesan el filtro o la distancia que migraron en él (33, 34, 49).

Otra técnica de introducción más reciente es la medida de la migración en geles de agarosa. Se preparan placas de agarosa en cajas de Petri y se cortan tres pocitos por muestra. En el pozo central se colocan las células y en los laterales el agente quimiotáctico en uno y en el otro sólo amortiguador para cuantificar quimiotaxis al azar. Las placas se incuban durante dos horas, al cabo de las cuales se fijan las células y se tiñen. Se mide la distancia que migran las células en la placa (33, 34, 49, 50).

Opsonización y fagocitosis:

Siendo la opsonización un proceso que facilita la fagocitosis se mide indirectamente a través de pruebas de fagocitosis. Son cuatro los métodos empleados:

- Estudios microscópicos.
- Determinación de la población bacteriana intracelular utilizando fenil-butazona para determinar la muerte intracelular y antibióticos para eliminar las bacterias extracelulares.
- Medida de la captación de bacterias marcadas radiactivamente usando monocapas de células adheridas a laminillas de vidrio o

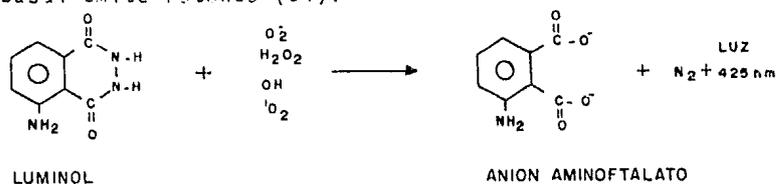
- células fagocíticas en suspensión. Las bacterias extracelulares son eliminadas lavando las células fagocíticas (49).
- Quimioluminiscencia (51).

Respuesta metabólica.

Esta es una medida de la capacidad de las células de responder al estímulo fagocítico poniendo a funcionar su maquinaria metabólica, lo que se manifiesta como un incremento en el consumo de oxígeno y producción de especies reactivas de oxígeno. Las pruebas para medirla son:

- Quimioluminiscencia: descrita en 1972 por Allen y cols. (52), consiste en medir la cantidad de fotones que emiten los fagocitos activos al producirse especies reactivas de oxígeno (39-44). Para ésto se estimulan las células a fagocitar con zimosano opsonizado o con partículas de látex y se mide la cantidad de fotones emitidos en un contador de centelleo líquido; inicialmente fué medida operando el contador con la ventana abierta de 0 a ∞ , una ganancia de 100% y un solo tubo fotomultiplicador operando, debido a que los niveles de luz generados son extremadamente bajos (53). Recientemente, muchos investigadores han empleado el compuesto luminol (5-amino-2, 3-dihidro-1,4-ftalacinediona) como amplificador de la respuesta de quimioluminiscencia (54-56) que permite utilizar un menor número de células, eliminar la necesidad de trabajar en la obscuridad (o bajo luz roja: 56), además de que puede ser utilizado para medir quimioluminiscencia en sangre completa (57-59). El luminol es oxidado por alguna especie reactiva de oxígeno generada durante el estallido respiratorio, aunque la reac

ción exacta no ha sido definida. La oxidación del luminol resulta en la producción del anión aminofталato excitado, que al relajarse a su estado basal emite fotones (54).



De esta forma se puede seguir la reacción en el contador de centelleo, operándolo con los dos tubos fotomultiplicadores "in coincidencia", como usualmente se maneja. Se mide la emisión de luz a diferentes períodos de tiempo y se traza una cinética de la cantidad de luz producida, lo cual es proporcional a la actividad metabólica de las células. Bien sea que se utilice como parámetro de medición la altura del pico de quimioluminiscencia o el área bajo la curva.

En el desarrollo de este trabajo hemos elegido precisamente el empleo de este método, que nos medirá la respuesta metabólica celular y la capacidad opsonizante del suero.

- Reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT). Este colorante, de color amarillo claro en solución (forma oxidada), es reducido por especies reactivas de oxígeno, principalmente por O_2^- , produciéndose un precipitado oscuro de formazán. Para realizar esta prueba se dejan adherir las células en una laminilla de vidrio y se desaffan con zimosano o con bacterias opsonizadas en presencia de NBT. Luego de un período determinado de tiempo se lava la laminilla, se fija y se tiñe. En las células con mecanismos íntegros de fagocitosis se depositan precipitados de formazán de color oscuro. Se observa y cuenta al microscopio el porcentaje de células

que los presentan(49).

- Iodinación: Se incuban los neutrófilos con yoduro (I^-) marcado radiactivamente y una partícula ingerible. Se precipitan las proteínas con ácido tricloro acético y se mide la radiactividad para saber cuanto yoduro incorporaron las células. El sistema celular que se encuentra involucrado en esta reacción es el de la mieloperoxidasa- H_2O_2 -haluro (49).

- Oxidación de Glucosa: Este parámetro puede ser medido por la adición al medio de glucosa- $1-^{14}C$ y la liberación de $^{14}CO_2$ el cual es colectado como bicarbonato- ^{14}C y medido en un contador de centelleo (49).

Capacidad Bactericida:

En esta prueba los leucocitos son puestos en contacto con bacterias e incubados durante 120 minutos a $37^\circ C.$, tomándose muestras a diferentes tiempos de incubación: 0, 30, 60 y 120 minutos, que se siembran en agar para cuantificar el número de unidades formadoras de colonias. Se comparan con el correspondiente control que no contenía células y se calcula el porcentaje de microorganismos que las células eliminaron (49).

3. Influencia del organismo patógeno sobre la respuesta inflamatoria:

Se han descrito diversos mecanismos que intentan explicar cómo algunos organismos invasores evaden la respuesta de defensa de un huésped. Excelentes revisiones de cómo evaden los organismos la respuesta inespecífica: fagocitosis, han sido realizadas por diversos autores (46-48,60) que describen cómo cada paso de este proceso puede ser bloqueado por algunos microorganismos patógenos:

Reconocimiento:

Se observó que Schistosomas adultos no eran atacados por células fagocíticas y se demostró que eran capaces de adquirir determinantes antigénicos de eritrocitos, como los antígenos de grupo A, B, H y Lewis B+, pero no los de Rh, M, N, S o Duffy (46).

Quimiotaxis:

Los antígenos o productos bacterianos juegan un papel muy importante en la iniciación de la respuesta quimiotáctica. Retardos en el arribo de células fagocíticas al sitio de la invasión permiten la multiplicación bacteriana. Se ha detectado que varios microorganismos disminuyen la migración de neutrófilos: Salmonella typhi, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, especies de Serratia; cepas virulentas de Brucella o de Mycobacterium tuberculosis; componentes bacterianos como el mucopéptido de la pared celular de Staphylococcus aureus o el ácido hialurónico de la cápsu

la de Streptococcus grupo A; toxinas bacterianas de Clostridium perfringens y Staphylococcus aureus.

Aunque el mecanismo por el cual estos organismos afectan la quimiotaxis no se conoce bien se postula que no estén activando a los fagocitos a migrar, que produzcan factores que inhiban la motilidad, o que fallen al generar sustancias quimiotácticas endógenas como C₅a. (46, 60).

Adhesión e Ingestión:

Algunos componentes de la superficie bacteriana le confieren propiedades antifagocíticas al microorganismo, como sería la cápsula, los gérmenes que la poseen, son entre otros: Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae grupo B, Yersinia pestis, Bacillus anthracis, Campylobacter fetus, Bacteroides fragilis, Pasteurella multocida y Cryptococcus neoformans (46-48).

Inhibición de la ingestión, a pesar de la adhesión:

Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasmas y virus de la influenza, sobreviven pese a que pueden adherirse a la membrana de la célula, probablemente por disminuir la fluidez de la membrana del fagocito, evitando así la ingestión (46, 47).

Estallido Respiratorio:

Se ha reportado que cepas virulentas de Salmonella typhi, Brucella abortus disminuyen la respuesta de quimioluminiscencia cuando se incuban neutrófilos con ellas, al igual que varios virus-

como serían el de Newcastle, herpes simplex, vaccinia y reovirus. En general se ha visto que la respuesta de quimioluminiscencia se encuentra incrementada cuando se trata de bacterias como agentes-patógenos (61-65) y disminuída en el caso de agentes virales como patógenos (63, 64, 66).

Degranulación:

Algunos microorganismos como Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium microti, Mycobacterium bovis y Toxoplasma gondii inhiben la fusión de los gránulos al fagosoma, desconociéndose aún el mecanismo de esta acción (46).

Ataque oxidativo:

Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Sarcina lutea, Brucella abortus; poseen sustancias capaces de eliminar las especies reactivas de oxígeno formadas durante la fagocitosis, como serían la catalasa, superóxido-dismutasa, o en el caso de Sarcina lutea que posee carotenoides, cuyos dobles enlaces reaccionan con el singlete de oxígeno (46, 47).

Ataque independiente de oxígeno:

Cepas lisas de Salmonella typhimurium y Salmonella minnesota, sobreviven mejor al ataque de extractos de gránulos primarios que las correspondientes cepas rugosas. Se postula que esto se debe a que las cepas lisas poseen cadenas laterales de lipopolisacárido que impiden estéricamente la acción de las proteínas de los gránulos (46, 47).

Escape del fagosoma:

Algunos organismos viven libremente en el citoplasma celular, no siendo reconocidos por la célula huésped como extrañas; tal es el caso de Mycobacterium bovis, Rickettsia tsutsugamushi, Toxoplasma gondii, algunos parecen tener acceso directo al citoplasma en vez de romper el fagosoma. (46).

Leucotoxicidad:

Muchos organismos poseen toxinas solubles que rápidamente dañan a las células fagocíticas, como Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Entamoeba histolytica. Aunque el mecanismo exacto puede diferir de un organismo a otro, las toxinas presentan la capacidad de despolarizar la membrana de la célula fagocítica - causando degranulación masiva de ésta y muerte celular. (46).

Como se puede apreciar, poco es lo que se conoce sobre el efecto que tienen los parásitos en estos mecanismos; generalmente se ha enfocado el estudio de éstos sobre cómo evaden la respuesta inmune (67), en donde se conocen algunos mecanismos como serían la variación antigénica, el enmascaramiento de antígenos y el efecto inmunosupresor, entre otros.

MATERIALES Y METODOS:

1. Pacientes.

Se estudiaron al inicio del tratamiento catorce pacientes del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", con diagnóstico presuntivo de absceso hepático amibiano. Cuatro de ellos presentaron además del AHA otros padecimientos infecciosos. Los casos fueron proporcionados por el Dr. José Ignacio Santos, con la colaboración del Dr. Luis Fernando Pérez González.

Del Hospital General de México de la Secretaría de Salud, se estudiaron siete casos de adultos con AHA, recién hospitalizados y sin tratamiento. Estos casos fueron seleccionados - bajo la dirección del Dr. Román Miranda.

En todos los pacientes estudiados el diagnóstico se - apoyo por el cuadro clínico (7), estudios de ultrasonido y gamma grama hepáticos (68) y reacciones de hemaglutinación indirecta - con antígenos de Entamoeba histolytica francamente positiva - (69). Finalmente, se comprobó que presentaban respuesta favorable al tratamiento con antiamebianos.

2. Controles.

Como controles se utilizaron muestras de sangre fresca de personas adultas sanas, sin antecedentes clínicos de amibiasis.

3. Sueros.

Se obtuvieron de los pacientes, o en su caso, de los -

controles, cuatro mililitros de sangre sin anticoagulantes y se separó el suero.

El suero AB empleado fué proporcionado por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional (I.M.S.S.) y guardado a -20° C. en alícuotas de 1 ml. hasta su uso. En iguales condiciones se guardaron sueros de pacientes y de controles.

4. Obtención de células.

Los leucocitos polimorfonucleares se obtuvieron según la técnica descrita por Bøyum (70).

Se extraen de los pacientes o controles 5 ml. de sangre periférica heparinizada (no más de 10 U de heparina/ml de sangre), los cuales se diluyen 1:1 con solución balanceada de fosfatos 0.15M pH 7.2 (PBS 7.2) y se les adicionan 3 ml de dextran 3% (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden), preparado en solución salina isotónica (SSI). Se dejan sedimentar los eritrocitos por treinta minutos a 37° C., en atmósfera húmeda y se obtiene el sobrenadante rico en leucocitos que se centrifuga durante 10 minutos a 200 g. Se descarta el sobrenadante y las células del botón se lavando veces con PBS 7.2 y se resuspenden finalmente en 1 ml de PBS 7.2.

Se estratificaron las células sobre Ficoll (Sigma Chem. Co. U.S.A.) -Hypaque 50% (Winthrop Laboratories N.Y.). $\rho = 1.077$ g/ml, se centrifugaron durante 20 minutos a 400 g. Se lavaron las células del botón con PBS 7.2 y se efectuó lisis de eritrocitos con choque hipotónico, que consiste en adicionar a las células resuspendidas en 1 ml de PBS 7.2, 3 ml de solución salina 0.2%, agitar suavemente durante 30 segundos y agregar 3 ml de so-

lución salina 1.6%, homogenizar y centrifugar las células por 5 minutos a 200 g., descartando el sobrenadante y resuspendiéndolas en 1 ml de PBS 7.2.

Se cuentan las células empleando una cámara de Neubauer y se ajustan a 2000 células/microlitro de PBS 7.2 para pruebas de quimioluminiscencia.

Se observa la pureza de la población de polimorfonucleares en preparaciones teñidas con colorante de Wright, y se mide la viabilidad de las células con el colorante vital azul - tripiano al 0.2% en SSI. La pureza y la viabilidad deben de ser mayores de 90% para que las células sean utilizadas.

5. Ensayo de Quimiotaxis.

Se empleó en el estudio de migración celular de la población estudiada del Hospital Infantil de México.

Se utiliza una microcámara de Boyden (48 Wel Neuroprobe, Bethesda, Maryland. 71, 72). Filtros de Nitrocelulosa (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA.) de diámetro de poro de 3 micras. El ensayo se realiza con sangre completa, ajustando la concentración de células a 2000/microlitro con solución de Gey balanceada con hepes y adicionada de albúmina al 1% (NaCl 135 mM, KCl 4.5 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.3 mM, $CaCl_2$ 1.5 mM, Hepes 10 mM, Dextrosa 1 mg/ml y albúmina 1%). Como quimioatrayente se emplea n-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (Sigma Chem. Co. U.S.A.) que es preparado a una concentración de 10^{-3} en SSI y guardado en alícuotas hasta su uso a $-20^\circ C$., cuando se diluye a una concentración de 10^{-10} en solución de Gey-hepes-albúmina.

Para medir migración al azar se prueban las células -

contra la solución de Gey-hepes-albúmina. La respuesta de quimiotaxis se prueba utilizando n-formil-L-metionil-L-leucil-fenilalanina.

Para probar el efecto del suero del paciente sobre sus propias células se adicionó éste al amortiguador o al quimioatrayente, al 20%.

El diseño de los ensayos a realizar es el siguiente:

Cel. Paciente	o	Cel. Control	+	Amortiguador
"	o	"	+	Quimioatrayente (Qty)
"	o	"	+	Amortiguador + 20% Suero Paciente
"	o	"	+	Qty + 20% Suero Paciente
"	o	"	+	Amortiguador + Suero Control
"	o	"	+	Qty + Suero Control

Los sueros fueron guardados a -20° C., y cuando se requirió inactivar el complemento se incubaron alicuotas a 56° C., por 30 minutos y se diluyeron al 20% con amortiguador ó quimioatrayente para probarlos sobre poblaciones celulares de individuos sanos. Como controles se utilizaron sueros de personas sanas, tratados de la misma manera.

Para cada experimento la cámara de Boyden se incubó durante 60 minutos a 37° C., se retira el filtro y se sumerge en ácido acético al 1.5% durante un minuto, para lisar a los eritrocitos. Se fija más de una hora en etanol-agua 1:1, se tiñe con hematoxilina, se deshidrata y se monta en resina histológica (Sigma Chem. Co. U.S.A.).

Las pruebas, realizadas por duplicado, fueron leídas -

cada una en tres diferentes campos, según el método de Zigmond y Hirsh (73). Los resultados (el promedio de las lecturas) se expresan como distancia migrada (en micras) = Distancia migrada hacia el quimioatrayente - Distancia migrada hacia el amortiguador.

6. Ensayo de Quimioluminiscencia.

Se estudiaron tanto los pacientes del Hospital Infantil de México como los del Hospital General.

Se realizó según la técnica descrita por Selveraj y col. (59), para sangre completa.

Para el estudio de fagocitosis en niños se efectuó una modificación que consiste en adicionar 150 microlitros de sangre, diluida en PBS 7.2 hasta obtener la concentración de 1000 PMN/ microlitro de sangre, en vez de los 10 microlitros de sangre completa que reportan ellos, debido a que el grupo de pacientes que manejamos en nuestro estudio presentan leucocitosis considerable.

Para adultos se adicionaron 100 microlitros de polimorfo nucleares (2000 PMN/microlitro de PBS 7.2)-

En el ensayo se utiliza Luminol 1 mM (Eastman Kodak - Col. Rochester, N.Y.), el cual se disuelve en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.3, mediante repetidas sonicaciones: seis de un minuto cada una (Lab-Line Instruments, Inc., Melrose Park, Illinois), a 80 ciclos por segundo, realizadas colocando el recipiente con el Luminol en baño de hielo, para prevenir el calentamiento. La solución resultante se filtra en una membrana de 0.22 micras de diámetro de poro (Millipore, Corp., Bedford, MA.) y se guarda en refrigeración protegida de la luz.

Como partícula a fagocitar se utilizó zimosano-A (de -

Saccharomyces cerevisiae: Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO), - que es suspendido en PBS 7.2, a una concentración de 10 mg/ml - agitándolo vigorosamente en vortex. Se centrifuga durante 10 minutos a 200 g., se elimina el sobrante y se le adiciona 1 ml de suero por cada 10 mg de zimosano-A, se incuba a 37° C. durante - 30 minutos, para opsonizarlo y finalmente se lava con PBS 7.2 y se resuspende a una concentración de 10 mg/ml con PBS 7.2.

El ensayo se realizó en viales de 20 ml a los que se les adiciona 4 ml de luminol 1 mM, 0.8 ml de solución de Krebs, 150 microlitros de zimosano-A opsonizado y las células separadas o sangre completa diluida (según sea el caso). Se agitan los - viales y se colocan en un contador de centelleo líquido (Beckman & Packard).

El diseño de los ensayos a realizar es el siguiente: -
Cel. Paciente o Cel. Control
Cel. Paciente o Cel. Control + zimosano opsonizado con suero AB
Cel. Paciente o Cel. Control + zimosano opsonizado con suero del paciente.

7. Análisis estadístico.

Se efectuó por medio de la determinación de t de student.

7. Estandarización de la técnica de quimiotaxis.

La microcámara de Boyden (48 Well Neuroprobe), consta de una porción inferior con 48 pozos de 3.18 mm de diámetro cada uno y una capacidad de 25 microlitros, una parte superior con 48 horadaciones de 3.18 mm de diámetro cada una y una capacidad de 50 microlitros de volumen, un empaque de silicón que se coloca en la unión de ambas partes de la cámara y 6 tornillos que fijan firmemente ambas porciones de la cámara (Figura 8).

El procedimiento para ensayos de quimiotaxis es el siguiente:

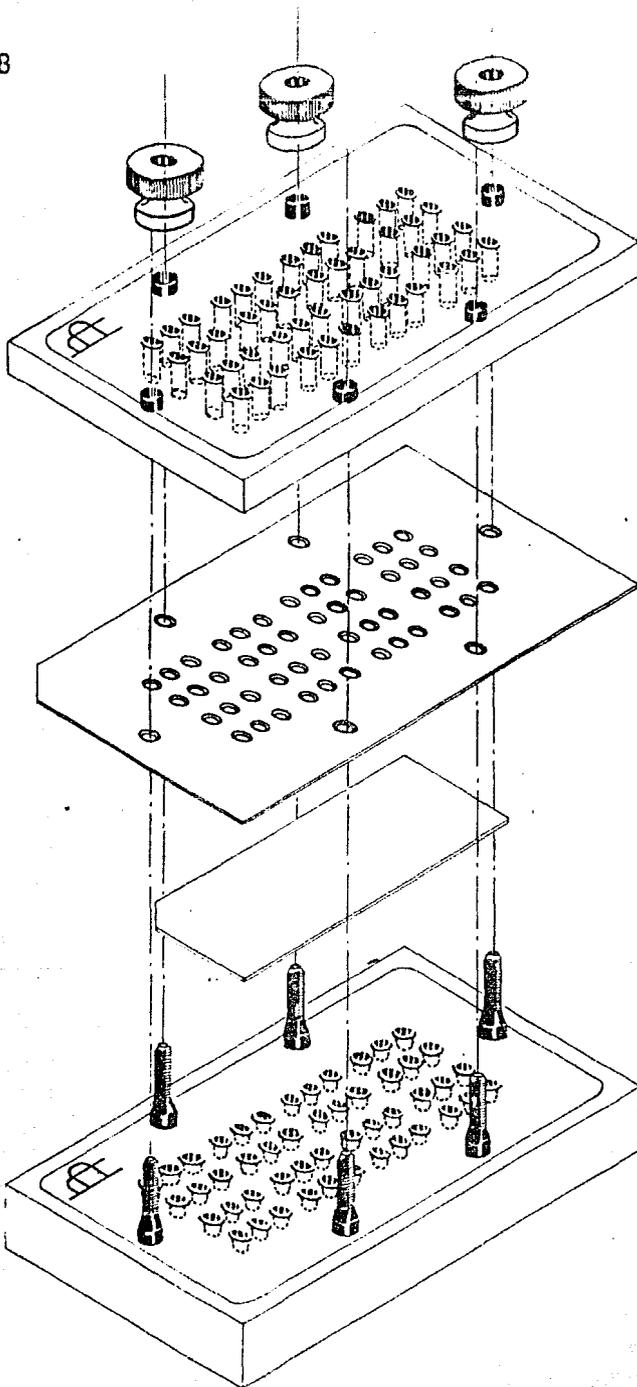
- Se ajusta el volúmen de la micropipeta de manera -- que se llene el pocito y se forme un pequeño menisco positivo, - para que cuando se coloque el filtro no queden atrapadas burbujas de aire. El volúmen empleado será aproximadamente de 25 microlitros.

- Se orienta la parte inferior de la Cámara de tal - forma que la marca NP se encuentre orientada hacia la parte superior izquierda. Se procede a llenar los pozos con el quimioatrayente o el control, lo cual no debe tomar más de 5', para evitar pérdidas por evaporación.

- Se realiza un pequeño corte en la esquina superior - izquierda del filtro, cuando el lado brillante de éste se encuentra hacia abajo.

- El filtro previamente humedecido con el amortiguador, se alza por los extremos con un par de pinzas y se coloca sobre la cámara (con la porción cortada orientada hacia la esquina superior izquierda), permitiendo a la porción central de - éste entrar primero en contacto con los pozos. Este paso debe -

Figura - 8



ser muy cuidadoso para que se eviten ajustes en la posición del filtro, lo cual podría provocar contaminaciones entre los pozos.

- Se coloca el empaque de silicón con la esquina cortada hacia la parte superior izquierda y enseguida la parte superior con la misma indicación de la marca NP hacia el extremo superior izquierdo. Se presiona firmemente al mismo tiempo que se colocan y aprietan los tornillos hasta que queden bien ajustados.

- Se llenan los pozos superiores con 50 microlitros - de células ajustadas a 2000 cel/microlitro. El llenado debe de ser realizado con cuidado sobre las paredes del pozo y rápidamente, para evitar que se formen burbujas de aire. En caso de existir éstas, deben removerse con la pipeta hasta que el pozo quede llenado adecuadamente.

- Se incuba la cámara a 37° C. y atmósfera húmeda durante 60 minutos, transcurridos los cuales la cámara se invierte sobre gasa para eliminar el volúmen de los pozos superiores, se remueven los tornillos y se separan ambas partes de la cámara. - Se retira el filtro y se introduce unos minutos en ácido acético al 1,5% para lisar los eritrocitos. Se fija en etanol-agua 1:1 por una hora o más.

- Después de haber fijado el filtro, éste es lavado con agua durante 10' y pasado a un recipiente que contenga hematoxilina, donde se deja teñir durante 30'.

- El filtro es vuelto a lavar con agua durante 10' y decolorado con HCL 0.5% remojándolo rápidamente en la solución y volviéndolo a lavar con agua.

- Se introduce en una solución de Chromatrope 3 R al 2% durante 1 minuto y se vuelve a lavar el filtro.

- El filtro así teñido está listo para deshidratarse y montarse en resina histológica.

- El filtro es colocado en etanol absoluto durante 5' luego en propanol 3', posteriormente en propanol-xilol por 3' y finalmente en xilon 5'.

- Se corta el filtro a la mitad para montarlo en un portaobjetos previamente adicionado de resina histológica, con el lado que contiene a las células hacia abajo y se cubre perfectamente con un cubreobjetos.

Lectura del Filtro:

- Esta se realiza según el método de Zigmond e Hirsh (73), anotando la distancia que existe de donde se encuentra la mayor densidad de células (en donde fueron colocadas éstas), hasta el campo en donde se observan cuando menos tres células. La distancia se lee con el tornillo micrométrico de un microscopio bajo el objetivo de 10 x. Cada prueba se realiza al menos por duplicado y se leen cuando menos tres campos de cada pozo. Se realiza un promedio de las lecturas, tomándose como valor final.

Para lograr obtener nigración en este sistema y contar con resultados reproducibles, primero se estableció el número adecuado de células para trabajar, siendo de dos millones de células por mililitro, tal como lo reporta la literatura. Un número mayor de células puede darnos preparaciones con tantas células que nos impiden leer las placas adecuadamente y menores cantidades de células se traducen en dificultad para localizar las células y con ello hace poco representativo el experimento.

Se preparó el n-formil-L-metionil-L-leucil-fenilalanina como agente quimioatrayente y se probaron varios medios para células en donde se obtuviera la mejor migración; estos fueron PBS 7.2, medio de Hank y medio de Gey adicionado o no con albúmina sérica bovina al 1%. En donde se observaron los mejores resultados fue el medio de Gey adicionado con albúmina 1%, dextrosa 1 mg/ml y hepes como amortiguador de pH.

Para seleccionar la mejor concentración de quimioatrayente se realizaron curvas de migración celular contra diferentes concentraciones de quimioatrayente (Gráfica 1), en donde se presenta el promedio de cinco experimentos. Se escogió la dilución 10-10.

También se probó otro quimioatrayente que fue el suero humano activado con zimosano que se probó a diferentes concentraciones obteniéndose los siguientes resultados:

<u>Quimioatrayente</u>	<u>Distancia migrada (micras).</u>
n-formil-metionil-péptido	93.75
Suero activado con zimosano 100%	60
" 50%	48.33
" 20%	48.33

Se observa que el n-formil-metionil-péptido actúa como un buen agente para estimular la migración de los leucocitos y se usa para medir ésta en el grupo de pacientes con AHA que se pretende estudiar.

Se realizaron también pruebas para determinar el tiempo de incubación del sistema para una óptima medida de la migración y lo definimos a una hora en base a que en ese tiempo observamos la mejor migración.

Finalmente la prueba quedó ajustada como se describió en el punto 4. de este mismo capítulo.

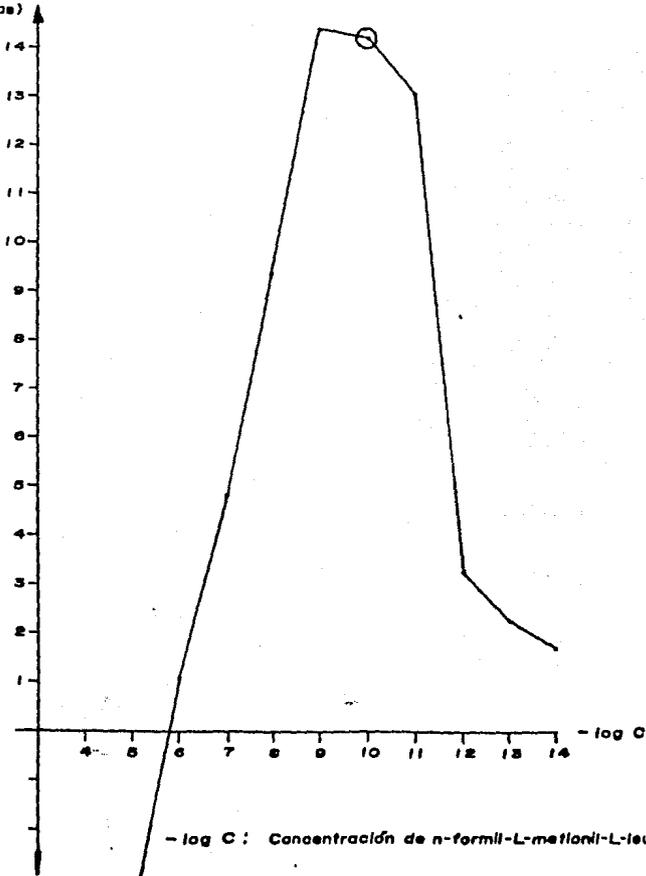
- log C

Distancia
(micras)

GRAFICA-1

14	1.71
13	2.285
12	3.25
11	13.04
10	14.20
9	14.37
8	9.366
7	4.83
6	1.07
5	-3.79
4	-9.05

Distancia
(micras)



8. Estandarización de la técnica de quimioluminiscencia:

a. Empleo del contador de centelleo.

La literatura reporta que una prueba de quimioluminiscencia puede ser leída en un contador de centelleo líquido para partículas beta o en un luminómetro, que es ya un equipo especialmente diseñado para pruebas de quimioluminiscencia (74).

Se contaba con un contador de centelleo líquido (Beckman LS-7500), por lo que se enfocó la atención sobre el manejo adecuado de este tipo de equipos para la realización de esta prueba.

Un contador de centelleo líquido está diseñado para percibir la emisión de partículas beta por los radionucleótidos tales como ^{14}C y ^3H (entre los más frecuentemente empleados). Posee dos tubos fotomultiplicadores que detectan fotones. Para el caso del material radioactivo los fotones son producidos cuando durante el curso de transformaciones nucleares un neutrón se transforma en un protón emitiendo simultáneamente un neutrino y un electrón que por viajar distancias cortas necesita de un sistema revelador que será proporcionado por un soluto y un solvente; la partícula beta excita al solvente y éste transmite la excitación al soluto que rápidamente retorna a su estado basal emitiendo cuantos de luz: fotones, en cantidad proporcional al número de partículas radioactivas que estén produciendo excitación en el solvente.

Sabiendo que durante la fagocitosis, como ya se describió anteriormente en generalidades, se emiten fotones, es posible aprovechar este sistema de detección, aplicándolo a la medi-

ción de la respuesta metabólica celular, condición para la cual - se hace necesario tomar en cuenta ciertos factores, algunos de - los cuales dependen de las características intrínsecas del equipo con que se trabaja y otros del sistema celular empleado.

Características del sistema celular:

- Las cantidades de fotones que se producen durante la fagocitosis son tan bajas, que se hace necesario utilizar un número muy grande de células para apreciar el fenómeno.

- El material y reactivos que se emplean deben de ser guardados en la obscuridad cuando menos durante 48 horas y el experimento realizado únicamente bajo luz roja, para evitar en lo posible que el contador detecte fotones del medio ambiente que no provengan de la actividad celular.

- Lo anterior se puede minimizar con el empleo de sustancias amplificadoras de la respuesta como lo es el luminol, - reactivo que para mayor actividad se preserva de la luz y que permite utilizar un número menor de células.

- Cuando se sigue durante un tiempo la emisión de luz - durante la fagocitosis se observa que se produce un incremento - gradual en la cantidad de luz (reportada por el contador como - cuentas por minuto: CPM), la cual llega a un tope máximo para posteriormente descender hasta su punto de partida, trazándose así - una curva. Los resultados pueden ser por tanto expresados como - altura del pico o como área bajo la curva, siendo por ello necesario realizar cinéticas de producción de luz en cada experimento.

Características del equipo:

- El contador de centelleo líquido de Beckman LS 7500, que se empleó, es un equipo que cuenta con programas definidos, especialmente diseñados para la lectura de radiactividad. Algunos de los parámetros dentro de cada programa son modificables y otros no, por lo que se tuvo cuidado de escoger un programa que pudiera ser adaptado a las necesidades del ensayo.

- Este equipo cuenta con un sistema integrado de compensación automática de "quenching", en el cual una perla de ^{125}Cs , al encontrarse cerca de la muestra, permite al equipo detectar en ella toda fuente de fotones que no provenga de material radiactivo, la registra en su memoria y posteriormente cuando la muestra es leída, resta la lectura inicial reportando solo las CPM que provengan del material radiactivo. En muestras de quimioluminiscencia, el equipo reconoce que solo poseen "quenching" y da resultados de cero CPM cuando se emplean estos programas; el equipo no admite que sea borrado este parámetro cuando se encuentra introducido en la memoria del programa. Por esta razón se debe escoger un programa que no tenga la orden de compensación automática de "quenching".

- La energía de los fotones emitidos durante la fagocitosis coincide con la producida por el ^3H y por ello es conveniente escoger un programa que incluya la región para lecturas de ^3H .

- Como es importante trazar una curva de producción de luz, se programa al contador de centelleo líquido para que cada muestra la lea poco tiempo y durante ciclos repetidos.

Con todas estas observaciones, el programa de este

equipo que mejor llena los requisitos es el # 9. No posee compensación automática de "quenching" y se puede programar para que cuente cada vial 0.5 min. durante 10 ciclos, lo que equivale (dependiendo del número de viales), si se utilizan doce viales (en el diseño de este experimento es lo requerido para un paciente y un control) a que cada vial sea leído aproximadamente cada siete minutos.

b. Condiciones óptimas de reacción.

1. Los reactivos fueron preparados como lo reporta la literatura (59), sin embargo al probarse el sistema se encontraron muy pocas CPM, aunque la cinética esperada sí se observa (Gráfica 2).

2. Se aumentó el número de células observándose un incremento en las CPM proporcional al número de células adicionadas.

<u># de Células:</u>	<u>Pico de QL:</u>
100,000 PMN/vial	280 CPM
300,000 PMN/vial	3,960 CPM
600,000 PMN/vial	41,506 CPM

Se aprecia que de acuerdo con lo reportado en la literatura (59) nosotros debemos incrementar grandemente el número de células adicionadas para obtener un efecto similar.

Pensando en las otras variables que pueden interferir en nuestro estudio se rectificó la preparación del luminol. Al volverlo a preparar se observaron respuestas similares a las anteriores. Se decidió entonces aumentar la cantidad de luminol, sólo que es un reactivo difícil de disolver y no se logró aumentar la concentración en solución. La otra opción fue no reali-

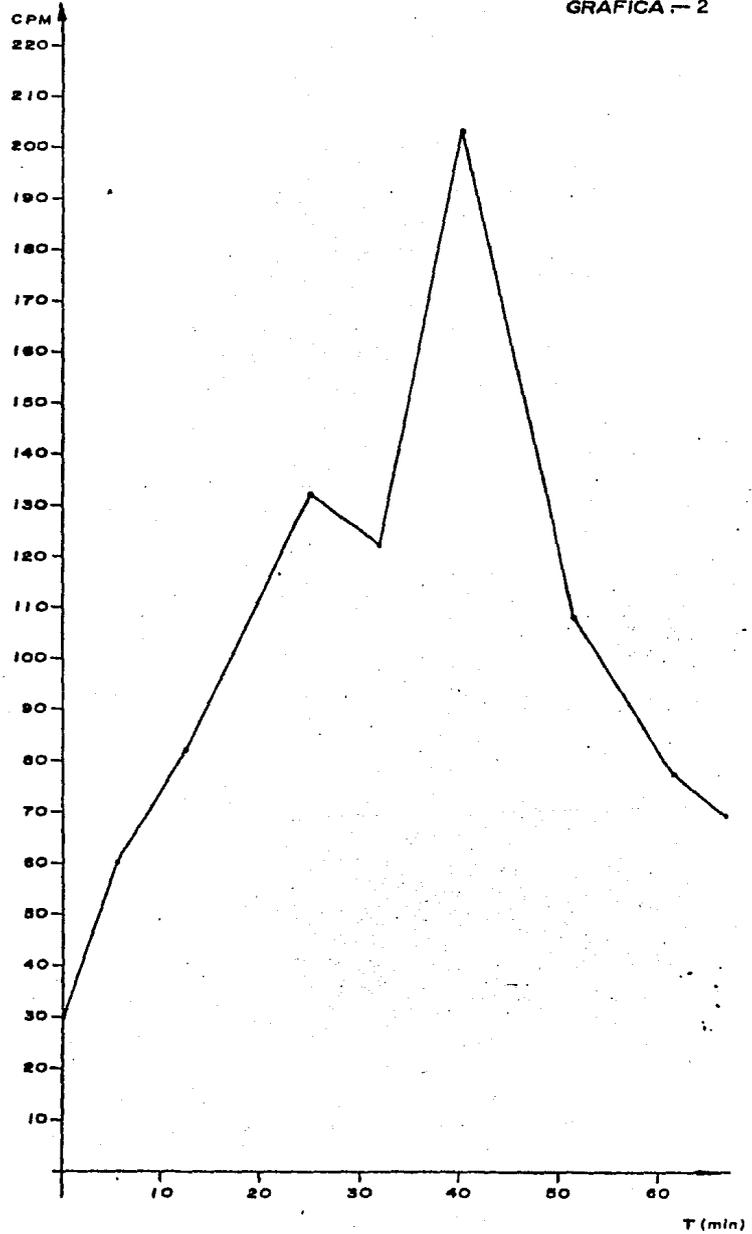
GRAFICA - 2

TIEMPO:

- 0.0
- 5.6
- 12.6
- 25.0
- 32.0
- 40.3
- 49.2
- 59.2
- 66.8

CPM

- 30
- 60
- 82
- 132
- 122
- 203
- 108
- 77
- 69

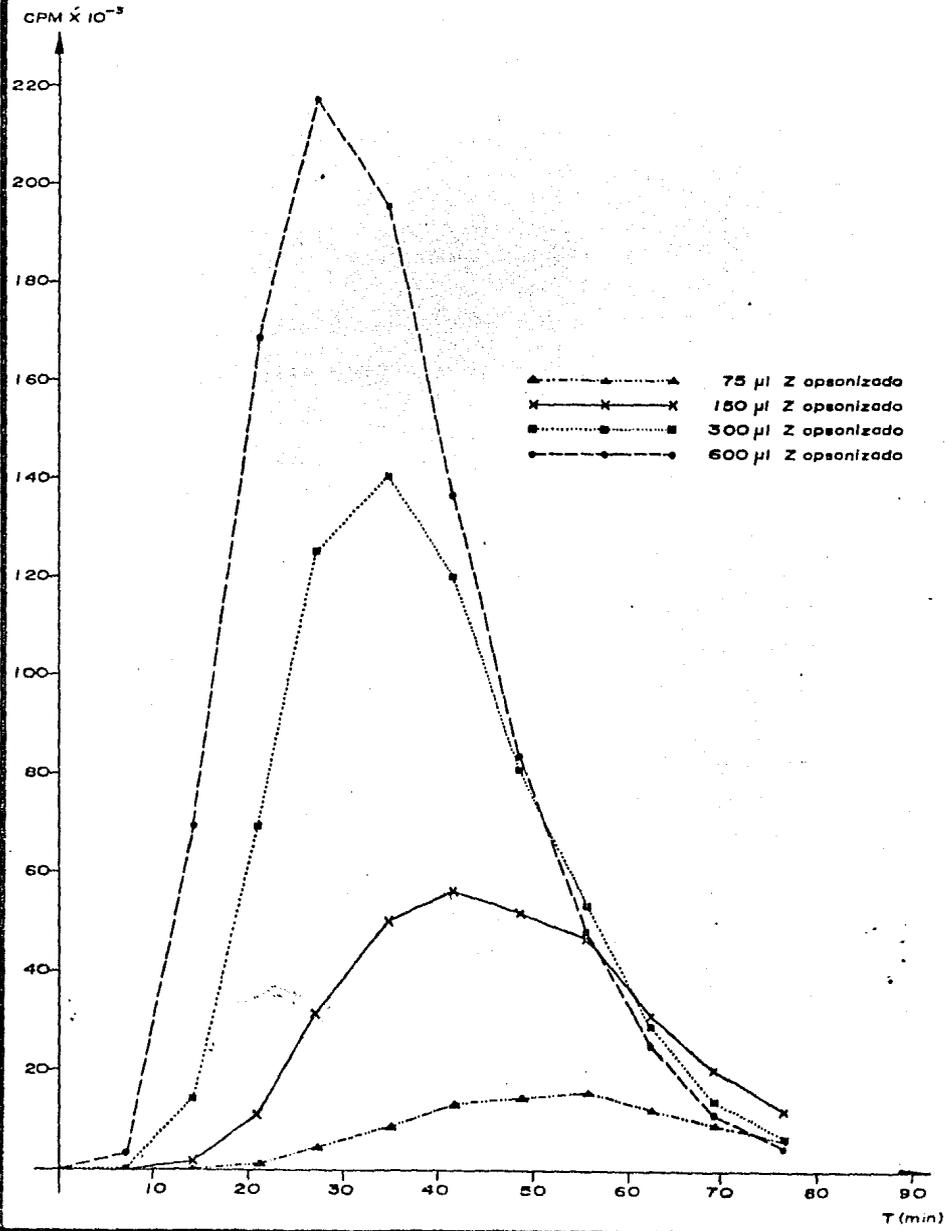


zar la dilución 1:2 antes de emplearse, que señalan las referencias, esta medida fué la que mejor funcionó y los siguientes pasos fueron determinar la cantidad de células que se emplearían y la concentración de zimosano adecuada.

Experimentos subsecuentes demostraron que la respuesta de quimioluminiscencia aumenta siempre cuando nosotros incrementamos el número de células. Por un lado cantidades superiores a un millón de células daban respuestas de quimioluminiscencia muy altas, hasta de más de un millón de CPM, siendo excesivas para el buen funcionamiento del equipo empleado; en ésta medida después de repetidos experimentos se decidió que el número óptimo de células era de 200,000 PMN/vial, para obtener una respuesta óptima de alrededor de 50,000 CPM para individuos sanos.

Con respecto a la cantidad óptima de zimosano tenemos la siguiente gráfica 3, que claramente nos indica que cuando aumentamos la concentración en el vial de zimosano opsonizado aumenta la respuesta de quimioluminiscencia y se acortan los tiempos en que se produce el pico de quimioluminiscencia. De aquí se eligió usar 150 microlitros de zimosano como lo señala la bibliografía (59) debido a que se tenía ya una buena respuesta con esto y además como se opsonizaba zimosano con suero del paciente, utilizar mayores concentraciones de zimosano se traducía en incrementar el volúmen de suero empleado por lo que se prefiere utilizar la cantidad mencionada.

GRAFICA - 3



IV. RESULTADOS:

1. Pacientes.

Las tablas I y II nos muestran un resumen de las características clínicas de los pacientes estudiados.

2. Migración celular:

En las tablas III, IV y V se presentan los resultados obtenidos con la prueba de quimiotaxis. La tabla VI muestra un resumen de estos resultados.

Se observa que las células de los pacientes muestran una respuesta de migración similar a la de los controles ($p > 0.1$) No así el grupo de pacientes que cursaron además con otras infecciones en donde encontramos una mayor migración que en el grupo-control. ($p < 0.01$).

3. Influencia del suero sobre la migración celular:

En estos experimentos se utilizaron sueros frescos provenientes de pacientes sin infecciones agregadas al AHA. Los resultados se presentan en la tabla VII, no observándose ningún efecto del suero sobre la migración de células de pacientes o de controles, al comparar con el sistema suero del control vs células del control. ($p > 0.1$).

4. Influencia del suero de pacientes en la migración de células de control:

Este experimento fué planeado para eliminar el efecto del complemento sobre la migración celular, así como al usar cé-

lulas provenientes de un solo individuo en cada experimento, se evitaba la heterogeneidad de la respuesta. Se utilizaron sueros guardados a -20°C ., e inactivado complemento. Los resultados - se muestran en la tabla VIII y tampoco se observa ninguna influencia del suero sobre la migración celular. ($p > 0.1$).

La tabla IX resume los resultados de los puntos 3 y 4.

5. Quimioluminiscencia:

La respuesta del grupo estudiado en el Hospital Infantil de México se presenta en la tabla X y se observa claramente incrementada en los pacientes con AHA ($p < 0.001$) apreciándose - que en el grupo de pacientes con infecciones agregadas el aumento en la respuesta es varias veces mayor al del grupo que cursó sólo con AHA.

En la tabla XI donde se presentan los resultados de - adultos con AHA vemos que la observación anterior se repite, observándose una respuesta mayor a la del control en el grupo de - pacientes con AHA ($p < 0.001$).

En la respuesta de las células hacia zimosano opsonizado con suero AB ó con suero del paciente no se observan diferencias ni para el grupo control, ni para los pacientes ($p > 0.1$).

La tabla XII presenta el resumen de estos resultados.

T A B L A I .

CARACTERISTICAS CLINICAS DE NIÑOS CON AHA

Sexo:	10 varones, 4 niñas.	
Edad:	5.82 \pm 4 años (10 meses-13 años)	
Duración de los síntomas antes de la terapia:	14.84 \pm 9.24 días.	
Terapia:	Metronidazol-Dihidrometina Metronidazol	13/14 1/14
Dolor abdominal:	14 / 14.	
Hepatomegalia:	13 / 14.	
Fiebre:	14 / 14.	
Diarrea:	5 / 14.	
Vómito:	4 / 14.	
Leucocitos / mm ³ :	12,757 \pm 6,463	
PMNs / mm ³ :	7,024 \pm 3,651	
Fosfatasa alcalina:	4.8 \pm 2.15.	7/14
TGO:	85.07 \pm 119.7	13/14
TGP:	35.61 \pm 35.98	13/14
Bilirrubina total:	1.07 \pm 0.76	12/14
Proteínas totales:	5.04 \pm 1.19	13/14
Albúmina:	2.49 \pm 0.55	13/14
Hemoglobina:	10.74 \pm 1.42	13/14
Absceso único:	12 / 14.	
Abscesos múltiples:	2 / 14. 2 niñas.	
AHA + otras infecciones:	4 / 14. 1 niña.	
Títulos de anticuerpos:	Todos > 4,096 para Ag de amiba. Hemaglutinación indirecta.	
Ultrasonido y Gammagrama:	Congruentes con AHA	14/14
Evolución:	Curación 100 %.	14/14.

T A B L A I I .

CARACTERISTICAS CLINICAS DE PACIENTES ADULTOS CON AHA

Sexo:	6 hombres, 1 mujer.	
Edad:	25 - 60 años.	
Terapia:	Metronidazol	7 / 7 .
Dolor abdominal:	7 / 7	
Hepatomegalia	7 / 7	
Fiebre	6 / 7	
Títulos de anticuerpos:	Todos > 4,096 para Ag de amiba.	
Ultrasonido y Gammagrama:	Congruentes con AHA	7 / 7 .
Evolución:	Curación 100 %	7 / 7 .

T A B L A V.

QUIMIOTAXIS: Respuesta de migración celular de pacientes con AHA que cursaron con otros problemas infecciosos asociados			
Problema Asociado	Amortiguador	Quimioatrayente	Distancia Migrada
Suboclusión Intestinal	12.05	96.25	83.75
Bronconeumonía	13.75	112.50	98.75
Peritonitis	93.75	158.75	65.00
AHA con fístula	58.75	147.50	88.75
\bar{x}	44.68	128.75	84.06
s	39.15	29.28	14.05

Los resultados se presentan como distancia medida en micras

\bar{x} : Media.

s : Desviación Estándar.

T A B L A V I .

MIGRACION DE LEUCOCITOS PMNs				
GRUPO	N	A	Qt	D. M.
NIÑOS:				
A. CONTROLES	14	± 35.01 ± 19.58	± 75.66 ± 27.00	± 40.65 ± 24.16
B. PACIENTES AHA	10	± 39.91 ± 24.06	± 90.41 ± 36.79	± 50.50 ± 24.14
C. PACIENTES AHA + OTRAS INFECCIONES.	4	± 44.68 ± 39.15	± 128.75 ± 29.28	± 84.06 ± 14.05

N: Número de muestra. A. Migración hacia el amortiguador.
 Qt: Migración hacia el quimioatrayente.
 D. M.: Distancia migrada. Diferencia de Qt - A.

T A B L A V I I .

INFLUENCIA DEL SUERO DE PACIENTES CON AHA SOBRE LA MIGRACION CELULAR									
CELULAS DE CONTROLES			CELULAS DE PACIENTES CON AHA.						
Presencia de suero de controles			Presencia de suero de controles			Presencia de suero de pacientes			
A	Qt	D. M.	A	Qt	D. M.	A	Qt	D. M.	
23.75	38.75	15.00	95.00	110.0	15.00	85.00	83.75	- 1.25	
63.75	101.25	37.50	50.00	81.25	31.25	72.50	81.25	8.75	
87.50	98.75	11.25	53.75	72.50	18.75	75.00	78.75	3.75	
90.00	98.33	8.33	73.33	99.16	25.83	112.50	110.83	- 1.67	
25.00	25.00	0.00	26.25	38.75	12.50	41.66	46.25	4.59	
82.50	103.75	21.25	40.00	70.00	30.00	40.00	112.50	41.25	
87.50	122.50	35.00	132.50	131.25	- 1.25	137.50	135.00	- 2.50	
123.75	130.00	6.25	120.00	126.25	6.25	110.00	125.00	15.00	
72.96	89.79	16.82	73.85	91.14	17.29	84.27	96.66	8.49	x
±34.20	±37.73	±13.51	±38.54	±31.39	±11.50	±34.42	±29.25	±14.50	s

A. Migración hacia el amortiguador
 D. M. Distancia migrada. Diferencia de Qt - A.

Qt. Migración hacia el quimioatrayente

T A B L A V I I I .

INFLUENCIA DEL SUERO DE PACIENTES CON AHA SOBRE LA MIGRACION DE PMNs DE
PERSONAS SANAS.

Presencia de suero de controles			Presencia de suero de Pacientes			
A	Qt	D. M.	A	Qt	D. M.	
80.00	90.00	10.00	87.50	91.25	3.75	
88.75	92.50	3.75	86.25	98.75	12.50	
95.00	93.75	- 1.25	93.75	95.00	1.25	
105.00	88.75	- 16.25	86.25	100.00	13.75	
95.00	98.75	3.75	103.75	107.50	3.75	
93.75	93.75	0.00	95.00	95.00	0.00	
93.75	103.75	10.00	100.00	100.00	0.00	
76.25	108.75	32.50	92.50	93.75	1.25	
x	90.94	96.25	5.31	93.12	97.65	4.53
s	± 9.12	± 6.97	± 13.75	± 6.44	± 5.06	± 5.50

A. Migración hacia el amortiguador.

Qt. Migración hacia el quimioatrayente.

D.M. Distancia Migrada. Diferencia de Qt - A.

T A B L A I X .

INFLUENCIA DEL SUERO DE PACIENTES CON AHA* SOBRE LA
MIGRACION DE LEUCOCITOS PMNs

GRUPO:	N	A	Qt	D. M.
<u>Cédula de controles:</u>				
A. Suero de Controles	8	+ 72.96 - 34.20	+ 89.79 - 37.73	+ 16.82 - 13.51
<u>Cédula de pacientes:</u>				
B. Suero de controles	8	+ 73.85 - 38.54	+ 91.14 - 31.39	+ 17.29 - 11.50
C. Suero de Pacientes	8	+ 84.27 - 34.42	+ 96.66 - 29.25	+ 8.49 - 14.50
<u>Cédula de controles :</u>				
D. Sueros de controles	8	+ 90.94 - 9.12	+ 96.25 - 6.97	+ 5.31 - 13.75
E. Sueros de Pacientes	8	+ 93.12 - 6.44	+ 97.65 - 5.06	+ 4.53 - 5.50

*Solo se incluyeron pacientes con AHA no asociado a otras infecciones
Los sueros fueron inactivados a 56°C por 30' y probados contra células de un mismo donador.

A. Migración hacia el amortiguador. Qt. Migración hacia el
D.M. Distancia Migrada. Qt - A. quimioatrayente.

T A B L A X.

QUIMIOLUMINISCENCIA: Respuesta de Fagocitosis hacia Zimosano opsonizado

	Controles	Pacientes AHA	Pacientes AHA + otras infecciones
	12,600	290,742	
	16,500	111,000	
	33,100	207,205	
	28,700	111,071	
	9,500	129,494	
	16,400	348,794	
	35,500	137,935	
	39,600	125,380	
	21,600	176,430	
	18,400	355,146	
	16,300		172,425
	18,800		870,829
	12,900		1,425,375
	24,900		746,235
\bar{x}	21,771	199,320	803,716
s	± 9,251	± 97,335	± 514,067

Los resultados se expresan en cuentas por minuto: CPM
 \bar{x} : Media. s : Desviación estándar.

T A B L A X I .

ADULTOS CON ABSCESO HEPATICO AMIBIANO				
QUIMIOLUMINISCENCIA: Respuesta de fagocitosis hacia Zimosano opsonizado				
Zimosano opsonizado con suero AB		Zimosano opsonizado con suero del paciente		
Controles	Pacientes	Controles	Pacientes	
55,000	272,500	57,500	457,500	
17,200	221,600	14,900	200,400	
11,100	80,300	10,300	50,300	
3,700	89,800	15,200	190,600	
56,200	790,200	60,500	603,400	
49,200	740,200	39,300	508,500	
52,500	373,000	47,950	158,450	
\bar{x}	34,986	366,800	35,093	309,878
s	23,184	290,838	21,404	209,371

Los resultados se expresan en cuentas por minuto : CPM

\bar{x} : Media.

s : Desviación estándar

T A B L A X I I .

RESPUESTA DE QUIMIOLUMINISCENCIA				
GRUPO	N	PICO DE QL : $X \pm s$		
NIÑOS:				
A. CONTROLES	14	21,771	\pm	9,251
B. PACIENTES AHA	10	199,320	\pm	97,335
C. PACIENTES AHA + OTRAS INFECCIONES	4	803,716	\pm	514,067
ADULTOS:				
RESPUESTA A ZIMOSANO OPSONIZADO CON SUERO AB.				
D. CONTROLES	7	34,986	\pm	23,184
E. PACIENTE AHA	7	366,800	\pm	290,838
RESPUESTA A ZIMOSANO OPSONIZADO CON SUERO DEL PACIENTE				
F. CONTROLES	7	35,093	\pm	21,404
G. PACIENTE AHA	7	309,878	\pm	209,371

V. DISCUSION:

El ensayo de quimiotaxis sólo fué realizado en niños - con AHA, debido a que los adultos habfan sido estudiados con anterioridad y suspendido el estudio por el cierre temporal del - Hospital General de México; el trabajo se continuó en niños ex--tendiéndose a estudiar quimioluminiscencia y quimiotaxis.

En el análisis de resultados, al estudiar la respuesta de quimiotaxis en los pacientes con AHA sin otras complicaciones, vemos que las células responden en forma muy parecida a las del grupo control y se plantea con ello varias posibilidades:

Primero, no debemos de perder de vista que la respuesta fué medida en sangre total y que se diluyó más que la del grupo control por la leucocitosis que presentan los pacientes. Esto puede eliminar, al menos en parte, el efecto de los factores séricos presentes. También distrae la comparación porque se disminuye la presencia de hemoglobina al diluir, eso sin tomar en cuenta que cuando este mismo tipo de pacientes con leucocitosis y hemoglobina disminuída cursan con infecciones asociadas al AHA, sí presentan sus células una mayor respuesta de migración al n-formil-L-metionil-L-leucil-fenilalanina.

Una consideración es que *Entamoeba histolytica*, como agente invasor, no produce sustancias que induzcan a los PMN a migrar a mayores velocidades, como se ha descrito para el caso de bacterias que pueden liberar sustancias que actúen como citotaxinas incrementando la migración. Ni tampoco cuenta con la presencia de citotaxinógenos (60). Simplemente *E. histolytica* -

está escapando de la vigilancia del huésped por medio de mimetismo antigénico (escondiéndose tras sustancias del huésped como podrían ser eritrocitos). Que E. histolytica no esté produciendo agentes que inhiban la migración celular (60, 46).

También pueden estar sucediendo ambas cosas, que puede poseer citotaxinógenos y/o citotaxinas, pero que éstos puedan estar siendo inhibidos por sustancias liberadas por E. histolytica.

Analizando el efecto que tiene el suero de los pacientes sobre la migración, vemos que se comporta de forma muy similar al de controles, no pareciendo existir en él sustancias que modifiquen la migración.

Al analizar los resultados de quimioluminiscencia vemos que la respuesta fagocítica está claramente incrementada en comparación con la de los controles, aunque no tanto como la de aquellos pacientes que cursaron con infecciones asociadas. Los estudios realizados en adultos corroboraron los hallazgos de que la respuesta fagocítica está incrementada en este tipo de pacientes. Además de que se observa que la capacidad opsonizante del suero es comparable a la del suero AB utilizado como control.

En el caso del grupo de niños con infección bacteriana agregada al AHA creemos que la respuesta fagocítica está incrementada principalmente por la infección bacteriana. La recuperación de éstos niños también fué buena, aunque más lenta.

También se observa que la desviación estándar en estas pruebas no es pequeña y lo atribuímos a que las poblaciones de neutrófilos de diferentes individuos no se activan en la misma proporción, respondiendo a pruebas de fagocitosis con diferente intensidad (75).

VI. CONCLUSIONES:

En conjunto vemos que leucocitos PMN provenientes de pacientes con AHA no presentan diferencias en su capacidad de migración con respecto a aquellos provenientes del grupo control - ni tampoco se observa que el suero modifique de alguna manera la respuesta. En el estudio de quimioluminiscencia la respuesta se encuentra claramente incrementada y la capacidad opsonizante del suero, normal.

Con estos datos se puede suponer que la respuesta inflamatoria en estos pacientes es normal, sin embargo, aún cuando éste en el primer estudio en su género realizado en personas que cursaron con infecciones parasitarias, por lo que no tenemos otras fuentes de comparación, observando que en los pacientes que cursaron además con otras infecciones bacterianas tanto la de migración como la quimioluminiscencia se encuentra incrementada mayormente, se propone que E. histolytica, probablemente posea mecanismos de mimetismo antigénico que le permiten pasar desapercibida para el huésped o bien que produzca factores que inhiban parcialmente la respuesta inflamatoria, traduciéndose como un efecto de activación moderada, que le permiten establecerse en un organismo como patógeno.

VII. BIBLIOGRAFIA:

1. Gutiérrez, G.; Ludlow, A.; Espinosa, G.; Herrera, S.; Muñoz, O.; Rattoni, N.; Sepúlveda, B.; National serologic survey. - Search for antibodies against E. histolytica in México. En - B. Sepúlveda and L. S. Diamond (ed.) Amibiasis: proceedings of the International Conference on Amebiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 1976. p 609-618.
2. Landa, L.; Anbanel, M.; Segovia, E.; Sepúlveda, B.: Seroepidemiología de la amibiasis en adultos. Arch. Invest. Med. - (Mex.) 3 (Suppl.): s 377. 1972.
3. Sepúlveda, B.: Amebiasis: Host-Pathogen biology. Rev. Infect. Dis. 4: 1242-1253. 1982.
4. Kretshmer, R. R.: Immune phenomena in Amebiasis. Surv. Immunol. Res. 3: 1.10. 1984.
5. Trissl, D.: Immunology of E. histolytica in human and animal hosts. Rev. infect. Dis. 4: 1154-1184. 1982.
6. Ravdin, J. I.; Guerrant, R. L.: A Review of the Parasite - Cellular mechanisms involved in the pathogenesis of Amebiasis. Rev. infect. Dis. 4: 1185-1209. 1982.
7. Sepúlveda, B.; Martínez Palomo, A.: Amebiasis. p 305-317 en Warren, K.S.; Mahmoud, A. A. F.: Tropical and Geographical Medicine. 1984.
8. Kumate, J.; Isibasi, A.; Llausas, A.: Perspectivas en la investigación de las enfermedades infecciosas y parasitarias. p. 9-71 en: La Salud de México y la Investigación clínica.- Antonio Velazques Arellano (ed.) UNAM Imprenta Universitaria 1985.
9. Alvarez-Alva, R.; de la Loza-Saldívar, A.: Frecuencia del Absceso hepático amibiano en Hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social en la República Mexicana. Arch. Invest. Med. (Mex.) 2 (Suppl.): s327-s332. 1971.
10. Amebiasis. Cap. V- p. 47-68, en Parasitología Médica. Tay, J.; Lara, R.; Velasco, O.; Gutiérrez, M. (eds.) 2a. Ed. - - Francisco Méndez Cervantes, México 1985.
11. Brandt, H.; Pérez-Tamayo, R.: Amebiasis. La Prensa Mexicana - Mexicana. p. 33-35. México 1970.
12. Kagan I. G.: Pathogenicity of E. histolytica. Arch. Invest. Med (Mex.) 5 (Suppl. 2): 457-464. 1974.

13. Brandt, H.: Amibiasis. En Correa, P.; Arias-Stella, J.; Pérez Tamayo, R.; Carbonell, L. M.: Texto de Patología- p. 226-232. 2a. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México - 1975.
14. Aguirre-García, J.: Peculiaridades histopatológicas de la lesión amibiana. Arch. Invest. Med. (Mex.) 1 (Suppl. 1) s147-s156. 1970.
15. Aikat, B. K.; Bhusnurmath, S. R.; Pal, A. K.; Chhuttani, P. N.; Datta, D. V.: Amoebic liver abscess- a clinicopathological study. Indian J. Med. Res. 67: 381-391. 1978.
16. Harrison, H.R.; Crowe, C. P.; Fulginiti, V.A.: Amebic - liver abscess in children: clinical and epidemiological features. Pediatrics 64: 923-928. 1979.
17. Ganguly, N. K.; Mahajan, R. C.; Datta, D. V.; Sharma, - S.; Chhuttani, P. N.; Gupta, A. K.: Immunoglobulin and-complement levels in case of invasive amoebiasis. Indian J. Med. Res. 67: 221-226. 1978.
18. Ravi, V. V.; Mithal, S.; Malaviya, A. N.; Tandon, B.N.; Immunologic studies in amoebic liver abscess. Indian J. Med. Res. 63: 1732-1736. 1975.
19. Ghosh, T. N.; Sen, P.C.: Phagocytic function in amebiasis. Indian J. Med. Res. 71: 207-212. 1980.
20. Kretschmer, R.; Collado, M. L.; Pacheco, M. G.; López- - Osuna, M.; Leucona, M.; Casto, E. M.; Arellano, J.; Salinas, M. G.: Inhibición of human monocyte locomotion - by products of axenically grown E. histolytica. Asociación de Invest. Pediátrica LIX Reunión reglamentaria. - p. 6-50.
21. Tsutsumi, V.; Mena López, R.; Anaya-Velazquez, F.; Martínez-Palomo, A.: Cellular bases of experimental amoebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 117: 81-91.1984.
22. Chadee, K.; Meerovitch, E.: The pathogenesis of experimentally induced amoebic liver abscess in the Gerbil (Meriones unguiculatus). Am. J. Pathol. 117: 71-80. 1984.
23. Ryan, G. G.; Majno, G.: Acute inflammation. A Review Am. J. Pathol. 86: 193-276. 1977.
24. Robbins, S. L.: Patología estructural y funcional. Inflamación y reparación. Cap. 3. pp 55-104. Ed. Interamericana, México 1975.

25. Marchesi, V. T.: Inflammation and Healing. Chap. 2 pp. 22-60. En Anderson's Pathology, Ed. Jhon M. Kissane, 8th Ed.-C.V. Mosby Company. 1985.
26. Pérez Tamayo, R.: Inflamación. Cap. 5 pp 34-70. En Correa, P.; Arias-Stella, J.; Pérez Tamayo, R.; Carbonell, L.M.: -Texto de Patología. 2a. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México. 1975.
27. Snyderman, R.; Goetzl, D. J.: Molecular and Cellular Mechanisms of Leukocyte chemotaxis. Science 213: 830-837. 1981.
28. Charles, G.: Cochrane. Mechanisms coupling stimulation and function in leukocytes. Federation Proc. 43: 2729-2731. - 1984.
29. Korchak, H. M.; Vienne, K.; Rutherford, L. E.; Wissmann, G.: Neutrophil stimulation: receptor, membrane, and metabolic events. Federation Proc. 43: 2749-2754. 1984.
30. Snyderman, R.: Regulatory mechanisms of a chemoattractant-receptor on leukocytes. Federation Proc. 43: 2743-2748. - 1984.
31. Pinter, R. F.; Sklar, L. A.; Jesaitis, A. J.; Schmitt, M.; Cochrane, C. G.: Activation of neutrophils by N-formyl chemotactic peptides. Federation Proc. 43: 2737-2742. 1984.
32. Gallin, J. I.; Seligmann, B.E.; Mobilization and adaptation of human neutrophil chemoattractant f-Mer-Leu-Phe receptors. Federation Proc. 43: 2732-2736. 1984.
33. Wilkinson, P. C.: Classification of Chemotactic Factors. - Chap. 4: 54-60. Endogenous Chemotactic Factors Chap. 8: - 120-130. Chemotactic Factors Produced by Microorganisms. - Chap. 9: 131-139. En Wilkinson, P. C. Chemotaxis and inflammation. Churchill Livingstone, Edinburgh and London. 1974.
34. Gallin, J. I.; Quie, P. G.: Leukocyte Chemotaxis Methods, Physiology and Clinical Implications. Raven Press. New York 1978.
35. Stossel, T. P.; Hartwig, J. H.; Yin, H. L.; Southwick, F. S.; Zaner, K. S.: The motor of leukocytes. Federation Proc. 43: 2760-2763. 1984.
36. Keller, H. M.; Wilkinson, P. C.; Abercrombie, M.; Becker, E.C.; Hirsch, J. G.; Miller, M.E.; Ramsye, W. S.; Zigmond, S. H.: A proposal for the definition of terms related to locomotion of leukocytes and other cells. Clin. Exp. Immunol. 27: 337-380. 1977.

37. Walker, R. I.; Willemze, R.: Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. *Rev. infectious Dis.* 3: 505-598. 1981.
38. Drutz, D. J.; Mills, K.: Inmunidad e Infección. Cap. 14 en: Stites, D. P.; Fudenberg, H. H.; Stobo, J. D.; Wells, J.V.: *Inmunología básica y clínica.* p. 201-225. Ed. El Manual Moderno, S.A. DE C.V. 5a. Ed. México, D.F. 1985.
39. Root, R. K.; Cohen, M. S.: The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev. infectious Dis.* 3: 505-598. 1981.
40. Klebanoff, S. J.: Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Annals of Internal Medicine.* 93: 480-489 1980.
41. Badwey, J. A.; Karnovsky, M. L.: Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 695-726. 1980.
42. Babior, B. M.: Oxidants from phagocytes: Agents of Defense and destruction. *Blood.* 65: 959-966. 1984.
43. Charette, R. P.; Hill, H. R.: Defects in phagocytic cells- Cap. 10. en: Kelly, V. C.: *Practice of pediatrics.* Harper and Row publishers, Inc, Hagerstown, Maryland. p 1-17. Vol. II. 1980.
44. Elsbach, P.: Degradation of microorganisms by phagocytic Cell. *Rev. infectious Dis.* 2: 106-128. 1980.
45. Elsbach, P.; Weiss, J.: A reevaluation of the roles of the O₂-dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev. infectious Dis.* 5: 843-853. 1983.
46. Densen, P.; Mandell, G.L.: Phagocyte strategy vs. microbial tactics. *Rev. infectious Dis.* 2: 817-838. 1980.
47. Spitznagel, J. K.: Microbial interaction with neutrophils- *Rev. infectious Dis.* 5: 5806-5822. 1983.
48. Horwitz, M.A.: Phagocytosis of microorganisms. *Rev. infectious Dis.* 4: 104-123. 1982.
49. Douglas, S.D.; Quie, P.G.: *Investigation of phagocytes in disease.* Churchill livingstone. Edimburgh London Melbourne and New York. 1981.
50. Palmblad, J.; Udén, A.M.; Venizelos, N.: The quantification of neutrophil orientation and migration under agarose - a new method for detecting directed and random movements. -- *Journal of Immunological Methods.* 44: 37-53. 1981.

- 51 Hill, H.R.; Hogan, N.A.; Bale, J.F.; Hermming, V.G.: Evaluation of nonspecific (alternative pathway) opsonic activity- by neutrophil chemiluminiscence. *Int. Archs. allergy appl.- Immun.* 53: 490-497 (1977).
52. Allen, R.C.; Stjernholm, R.L.; Steele, R.H.: Evidence for - the generation of an alectronic excitation state (s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in - bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: - 679-684. 1972.
53. Cheson, B. D.; Christensen, R.L.; Sperling, R.; Kohler, B.E.; Babior, B.M.: The origin of the chemiluminiscence of phago- cytosing granulocytes. *J. Clin. Invest.* 58: 798-796. 1976.
54. Allen, R.C.; Loose, L.D.: Phagocytic activation of a lumi-- nol-dependent chemiluminiscence in rabbit alveolar and peri- toneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69: - -- 245-252. 1976.
55. Stevens, P.; Winstons, D.J.; Van Dyke, K.: In vitro evalua- tion of opsonic and cellular granulocyte function by luminol dependent chemiluminiscence: utility in patients with severe neutropenia and cellular deficiency states. *Infect. Immun.-* 22: 41 . 1978.
56. Prendergast, E.; Pactor, R.A.: Simple procedur for measuring neutrophil chemiluminiscence. *J. Clin. Microbio.* 13: 390- - 392. 1981.
57. Tono-Oka, T.; Ueno, N.; Matsumoto, T.; Onkawa, M.; Matsumo- to, S.: Chemiluminiscence of whole blood. *Clinical Immunolo gy and Immunopathology.* 26: 66-75. 1983.
58. Faden, H.; Maciejewsky, N.: Whole blood luminol-dependent - chemiluminiscence. *J. Reticuloendothel. Soc.* 30: 219 1981.
59. Selveraj, R.J.; Sbarra, A.J. Thomas, G.B.; Cetrulo, C.L.; - Mitchell, G.W.: A microtechnique for studying chemiluminiscen ce response of phagocytes using whole blood and its applica- tions to the evaluation of phagocytes in pregnancy. *J. Reti culoendothel. Soc.* 31: 3-16. 1982.
60. Wilkinson, P.C.: Leukocyte locomotion and chemotaxis: Effects of bacteria and viruses. *Rew. infectious Dis.* 2: 293-318. - 1980.
61. Miller, R.M.; Carbus, J.; Hornick, R.B.: Lack of anhanced - oxygen consumption by polymorphonuclear leukocytes on phago cytosis of virulent Salmonella typhi. *Science* 175:1010-1011 1972.

62. Kossack, R.E.; Schadelin, J.; Guerrant, R.L.; Densen, P.; - Mandell, G.L.: Dimished neutrophil oxidative metabolism following phagocytosis of virulent Salmonella typhi (abstract) Clin. Res. 26: 28A. 1978.
63. Barbour, A.G.; Allred, C.D.; Solberg, C.O.; Hill, H.R.: Chemiluminescence by polymorphonuclear leukocytes from patients with active bacterial infection. J. Infect. Dis. 141: 14-26 1980.
64. Mc. Carthy, J.P.; Bodroghy, R.S.; Jahrling, P.B.; Sobocinski, P.Z.: Differential alterations in host peripheral polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence during the course of bacterial and viral infections. Infect. Immun. 30: 824--831. 1980.
65. Robinson, P; Wakefield, D.; Breit, S.N.; Easter, J.F.; Penny, R.: Chemiluminescent response to pathogenic organisms: normal human polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. - 43: 744-752. 1984.
66. Faden, H.; Sutyla, P.; Ogra, P.L.: Effect of viruses on luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. Infect. Immun. 24:673-679. 1979.
67. Bloom, B.R.: Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. Nature 279: 21-26. 1979.
68. Aguirre Torres, J. de J.; Velázquez Venegas, E.: Estudio -- comparativo entre la centelleografía y la ultrasonografía en el diagnóstico del absceso hepático amibiano. Rev. Gastroenterol. Mex. 49: 87-90. 1984.
69. Kessel, J.F.; Lewis, W.P.; Pasquel, M; Turner, J.A.: Indirect hemagglutination and complement fixation test in amebiasis. A.J. Trop. Med. Hyg. 14: 540-550. 1965.
70. Byum, A.: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. 5: Suppl. 5. 1976.
71. Richards, K.L.; Mc. Cullough, J.: A modified microchamber - method for chemotaxis and chemokinesis. Immunological communications. 13: 49-62. 1984.
72. Falk, W.; Goodwin, R.; Leonard, E.J.: a 48-Well microchemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. J. Immunol. Methods. 33: 239-247. 1980.
73. Zigmond, S.H.; Hirsch, J.G.: Leukocyte locomotion and chemotaxis. J. Exp. Med. 137: 387-410. 1973.
74. Andersen, B.R.; Brendzel, A.M.: Use of a unique chemiluminescence spectrometer in a study of factors influencing granulocyte light emission. J. Imm. Methods 19: 279-287. 1978.

75. Bass, D.A.; Olbrants, P.; Szejda, P; Seeds, M.C.; McCall, -
C. E.: Subpopulations of neutrophils with increased oxidati
ve product formation in blood of patients with infection. -
Journal of Immunology. 136: 860-866. 1986.